

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-180378

(P2003-180378A)

(43) 公開日 平成15年7月2日(2003.7.2)

(51) IntCl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/48	Z 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/48		1/68	A 4 B 0 2 4
1/68		G 0 1 N 33/48	Z 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/48		33/53	M
33/53		33/566	
審査請求 未請求 請求項の数13 O L 外国語出願 (全 106 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-253933(P2002-253933)

(22) 出願日 平成14年8月30日(2002.8.30)

(31) 優先権主張番号 6 0 / 3 1 6 6 1 4

(32) 優先日 平成13年8月31日(2001.8.31)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 399047002

ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ  
ファウンデーション

アメリカ合衆国・ユタ州 84108・ソルト  
レイク シティ・スイート 110・アラ  
ビーン ドライブ 615

(71) 出願人 502316980

アイダホ テクノロジー  
アメリカ合衆国・ユタ州 84108・ソルト  
レイク シティ・ワクラ ウェイ 390

(74) 代理人 100071283

弁理士 一色 健輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リアルタイムで内部標準を用いて遺伝子を定量する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 核酸定量キットとサンプル中に存在する標的核酸の最初の濃度とマスフラクションを決定する方法の提供。

【解決手段】 温度安定性DNAポリメラーゼの存在下、核酸配列を温度サイクルするサンプル中の標的核酸のコピー数またはマスフラクションを決定するためのリアルタイム競合物定量ポリメラーゼ鎖反応(PCR)と、マスフラクション情報を与えるためのPCRを使う方法と使わない方法での熱力学に基づいたシグナル加工アルゴリズムの使用。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 テストサンプル中に存在する第一と第二の標的核酸のマスフラクションを決定する方法であって、(a) 前記標的核酸にハイブリダイズする量に関連してシグナルを出すように構成され、さらに、融解温度を基礎にして該標的核酸を識別するように構成された蛍光核酸指示剤に、該標的核酸を接触させるステップと、(b) テストサンプルを照射するステップと、(c) 蛍光の変化をモニターして融解曲線を生成するステップと、(d) 該標的核酸のマスフラクションを決定するために熱力学を基礎にしたシグナル処理アルゴリズムを用いるステップと、を含む方法。

【請求項2】 標準融解曲線を有する前記各標的核酸に対して該標準融解曲線 $f_i$ を規定するステップと、未知のサンプルの融解曲線 $f_{mix}$ を規定するステップと、をさらに含み、熱力学を基礎にしたシグナル処理アルゴリズムは、補正パラメーター $\sigma$ 、前記未知の試料に存在する各標的核酸のマスフラクション $m_i$ と、残りの関数の融解温度及びマスフラクションのパラメーターを同時に見つけ、組み合わせられた最適化と反復過程を用いて

【式1】

$$\int_{T_0}^{T_1} \left\| f_{mix}^{\sigma} - \sum_i m_i f_i^{\sigma}(T) - f'(T) \right\| dT,$$

を最小にし、前記最適化と反復過程は、マスフラクションが $1-\epsilon$ （ここで、 $\epsilon$ は許容誤差値）より大きくなるまで繰り返されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記標的核酸のマスフラクションが、ある遺伝子中の欠失や重複に関する情報を与えることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記蛍光核酸指示剤が、蛍光でラベルされた配列特異的なオリゴヌクレオチド・プローブを含むことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 配列特異的なオリゴヌクレオチドが、FRETペアプローブシステムと単一ラベルのオリゴヌクレオチドからなるグループから選択されることを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記蛍光核酸指示剤に対し、前記第2の標的核酸が前記第1の標的核酸の競合物であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 前記テストサンプルが、熱耐性ポリマーゼと、前記第1の標的核酸を増幅するために構成されたオリゴヌクレオチド・ペアとをさらに含み、該標的核酸を増幅するステップをさらに含み、前記増幅するステップが、熱力学を基礎にしたシグナル処理アルゴリズムを用いるステップの前におきることを特徴とする

請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 生物学的試料中に存在する標的核酸を定量する方法であって、

(a) 単一の反応容器中で、前記試料の少なくとも一部と、熱耐性ポリマーゼと、既知の濃度の競合核酸と、PCRプライマー用のオリゴヌクレオチドペアと、オリゴヌクレオチドプローブとを混合するステップを含み、

前記PCRプライマー用のオリゴヌクレオチドペアは前記標的核酸及び前記競合核酸の選択された部分を増幅するために構成され、該競合核酸は該標的核酸の対応する領域とは異なる配列を有する固有の部位を有し、該競合核酸と該標的核酸とは本質的に同じ効率で増幅され、前記オリゴヌクレオチドプローブは、第1の蛍光体でラベルされ、該競合核酸の該固有の部位と、該標的核酸の対応する部分にハイブリダイズするように構成され、該オリゴヌクレオチドプローブは、それぞれ相補的な該標的核酸と該競合核酸のうち少なくとも一つにハイブリダイズする結果、該蛍光体からの蛍光量が変化し、

(b) 該標的核酸と該競合核酸の選択された部分を増幅するステップを含み、(c) 該生物学的試料を照射し、該第1の蛍光体からの蛍光の変化をモニターするステップを含む方法。

【請求項9】 前記照射するステップが融解曲線解析を含むことを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記融解曲線解析が、熱力学を基礎にしたシグナル処理アルゴリズムを用いることを含むことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】 前記競合核酸は、前記標的核酸の第1の領域と同一の配列を有する第1の対応する部位をさらに含み、

前記オリゴヌクレオチドプローブは、該競合核酸の前記固有の部位に隣接し、該標的核酸の第2の領域に隣接して、該競合核酸の該第1の部位と、該標的核酸の該第1の領域とにハイブリダイズするように構成されたアンカープローブであり、

前記混合するステップが前記反応容器中で標的プローブと競合プローブを混合するステップを含み、前記競合プローブは第2の蛍光体でラベルされ、該競合核酸配列の該固有の部位にハイブリダイズするように構成され、前記標的プローブは第3の蛍光体でラベルされ、該標的核酸配列の該第2の領域にハイブリダイズするように構成され、

該アンカープローブ、該標的プローブ、及び該競合プローブが、それぞれ相補的な標的核酸と競合核酸とに対してハイブリダイズすることにより、第1の蛍光体と第2の蛍光体、及び第1の蛍光体と第3の蛍光体が、共鳴エネルギー転移関係におかれることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項12】 ステップ(c)が時間の関数として蛍

光をモニターすることを含み、(d) 前記標的核酸に対する増幅プロファイルと、前記競合核酸に対する増幅プロファイルを作製するステップと、(e) 前記標的核酸に対する該増幅プロファイルを前記競合核酸に対する該増幅プロファイルと比較して、競合核酸と標的核酸の間のサイクル・シフトを決定するステップと、をさらに含む請求項8に記載の方法。

【請求項13】 様々な既知の濃度の前記競合核酸を用いてステップ(a)からステップ(c)までが繰り返され、

(f) 等式  $\log C_0 = \log E(\Delta n) + \log T_0$

(ここで、 $C_0$ は競合核酸の初期濃度、 $E$ は増幅効率を表し、 $\Delta n$ は前記競合核酸と前記標的核酸の間の前記サイクル・シフトを表し、 $T_0$ は標的核酸の初期濃度を表す。)を用いて、標的核酸の初期濃度を決定するステップとをさらに含み、生じた直線が増幅効率の対数値と同じ傾きと、標的核酸の初期濃度の対数値と同じ切片を有する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【背景となる技術】ポリメラーゼ鎖反応(PCR)は、あらかじめ選択した部分のDNAを大量に合成する技術である。この技術は分子生物学では基礎的なものであり、臨床の研究室にとっては最初の実験的分子技術である。PCRはDNAを2つの相補的な鎖に分離し、合成が開始される所定の部分のDNA端で、各一本鎖のDNAにプライマーが結合し、DNAポリメラーゼが加えられてプライマーが結合した場所からそれぞれの鎖に対する相補的な鎖が合成されることにより達成される。この過程は、十分な量の選択されたDNA断片のコピーが合成されるまで繰り返される。

【0002】典型的なPCRの間、2本鎖DNAはDNAを含むサンプルを2つのDNA鎖が分離する変性温度(即ちDNAの「融解温度」)にまで上げられることにより1本鎖DNAに分けられ、さらにサンプルは特定のプライマーが結合(アニール)する低い温度に冷却され、複製される(伸長)。具体的には、Taqポリメラーゼや、TaqポリメラーゼのStoffel断片やKlenTaq1ポリメラーゼ(Taqポリメラーゼの5'核酸分解酵素活性が欠失した変異体—米国特許第5,436,149号を参照)などのTaqポリメラーゼの派生物のような、熱耐性のポリメラーゼが、ポリメラーゼ鎖反応には利用されている。

【0003】1991年から1998年の間に、定量的PCR法を用いた論文の数は10倍にまで増加した。定量的PCRの使用量が増加した主な理由の1つは、最も良いプロットティング法と比較してもPCRは5桁の違いで感度が良いという事実に基づく。この感度のため、PCRは、定量性を測るツールとして非常に望ましい。しかし、指数的に増幅するシステムの使用は本来定量には適していない。サンプル間の大きさの小さな違いは、40回の倍増を通して増

幅されると結果的に巨大な違いになりえる。

【0004】速度論的PCR

典型的なPCR反応の特性図は、初期遅延相、指数増加相、平坦相の3つの時期に分けることができると考えられる。遅延相は主に、機器の感度やPCR産物を検出するために用いられるプローブ系のバックグラウンドシグナルの反映である。指数増加相は機器によって検出されるために十分な量の産物が蓄積されると始まる。この「対数」相の間、増幅の経過は  $T_n = T_0(E)^n$  ( $T_n$  はn サイクル目における標的配列の量、 $T_0$  は最初の標的の量、 $E$  は増幅効率)の等式によって記述される。最終的に、平坦相において増幅効率は急激に落ちる。産物はアニリングするプライマーに対し、ますます競合し、酵素の量が限られてくる。指数等式は、平坦相にはもはや維持されない。

【0005】ほとんどの定量的情報は指数サイクル時に認められるが、指数サイクルは典型的には40 サイクルのうち4 か5 サイクルしかない。伝統的PCR法を用いてこれらの情報を与えてくれるサイクル数を探すためには、反応液を数本の反応チューブに分けていろいろなサイクル数の後のPCR産物を試験しなければならない。これにはたくさんのチューブを試験するか、または実験を行う前にその答えに対する素晴らしい名案が必要である。一度指数相の位置が決定されたら、実験中の相は既知の標準と比較されそのコピー数が計算される。

【0006】競合的定量的PCR

競合的定量的PCR法は、反応の指数相を見つけるのに伴う困難を克服するためと、よりよい正確性を得るために開発された。標的配列を増幅するために用いられるのと同じプライマーで増幅される競合配列が作製される。競合物は標的物と、通常長さまたは内部の配列により区別され、増幅された後競合物と標的の量比が求められる。もし標的と競合物が同じ効率で増幅されるなら、反応後の量比は最初の量比と同じである。増幅効率の減少が同じ速度で起こるなら、平坦相までこれはあてはまる。それゆえ、もはや指数領域を見つけることは問題にはならない。同じチューブ内に未知量の標的と共に標準試料を加えることは、速度論的方法では不可能であったさらなる制御を可能にする。例えば、競合物をmRNAの精製前に加えておけば、サンプル調整と逆転写の際の量の揺れに対するコントロールとなるであろう。

【0007】現在使用できる競合的PCR法の使用には、いくつかの欠点が存在し続けている。まず、競合物の配列は同じような増幅効率を得るためにできる限り標的配列と類似した配列で作製される必要があるが、それらの2つの配列はお互いに区別されなければならない。もし競合物が標的と似すぎていたら、PCRの間に鋳型に対する産物の割合をゆがめる異種2本鎖が形成される。

【0008】さらに、競合物は標的に近い濃度で未知のサンプルに添加されなければならない。もし片方の産物

がバックグラウンドより上がる前に、もう一方の産物が平坦相に入ってしまうと、サンプルから定量的な情報が得られなくなる。通常未知のサンプルは数本に分けられ、様々な濃度の競合物と混合される。

【0009】競合的定量法については他の指摘も上がってきている。よくある批判は、あらゆる努力をしたところで、標的と競合物は別々に増幅されたときは同じ効率で増幅されたとしても（明白なコントロール）、一つの試料中の標的と競合物は異なる効率で増幅されてしまうかもしれないということである。標的と競合物が同じ容器に入れられ、試薬に限られるようになると、2つの増幅反応の効率は異なる速度で変化してしまうかもしれない。標的と競合物の間の長さの違いは、長い産物はより効果的にプライマーと競合し、より試薬の制限によって影響されるかもしれないというようなことは最もよくある指摘である。もしPCR反応中にヘテロ2本鎖を形成する問題がなかったとしたら、これらの指摘に対しては、標的と競合物を十分似たものにするにより答えられる。

#### 【0010】リアルタイム定量的PCR

機器の発達によって今やPCR反応のリアルタイムでの観察が可能となり、それゆえ反応の対数相を探す問題が些細なこととなった。

高速サイクルPCRの使用も含めて、温度サイクルは当業者には知られた技術を用いて行われるであろう。高速サイクル技術は、キャピラリーチューブのように体積に対して大きな表面積を持つサンプル容器を用いることによって可能になる。体積に対して大きな表面積があるサンプル入れを使用することにより、生物学的サンプル全体にわたって速い温度反応と温度均一性が与えられる。改善された温度均一性は、増幅の間PCRを観察するために用いられるあらゆる解析技術の正確性もまた増加させる。

【0011】本発明の具体的な例では、核酸配列の増幅は米国特許第5,455,175号に記載されている機器と技術を用い、温度安定性DNAポリメラーゼの存在下において核酸配列を温度サイクルすることにより行われている。本発明によると、反応を蛍光で観察しながらDNAサンプルの中の1つあるいはの標的領域をPCRにより増幅が行われる。

【0012】定量的PCRのそれぞれのサイクルにおいて観察するための蛍光の最初の使用は、Higuchiらの「特異的DNA配列の増幅と観察を同時に行う方法」Bio. Technology, 10:413-417, 1992により開発され、蛍光物質としては臭化エチジウムが使用された。産物濃度の相対的な測定のために、蛍光物質は1サイクルに1回獲得された。最初に観察可能な蛍光がバックグラウンドの上（閾値）に観察されるサイクル数は、最初に含まれるサンプルのコピー数に比例するので、標準曲線を作製することができるようになる。その後、ポリメラーゼの5'エキ

ソヌクレアーゼ活性を利用した、プローブを基にした蛍光検出法が開発された。これは、リアルタイム速度論的法を、配列特異的な検出を可能にするように改良した。

【0013】別な方法として、DNAの増幅される標的領域中の特異的な遺伝子座にハイブリダイズするように合成された蛍光ラベルのハイブリダイゼーション・プローブの存在下で、DNAサンプルの1つあるいは複数の標的領域のPCR増幅を行うことができる。具体的な例では、このハイブリダイゼーション・プローブ・システムは、DNA配列の近隣領域にハイブリダイズする2つのオリゴヌクレオチドプローブからなり、それぞれのオリゴヌクレオチドプローブは蛍光エネルギーが転移ベアのそれぞれでラベルされている。この例では生物学的サンプルの中の標的核酸配列の存在は、2つのラベルされたオリゴヌクレオチドの間の蛍光エネルギーの転移を計測することにより検出される。

【0014】これらの機器や蛍光観測技術は速度論的PCRを、伝統的な競合的PCRより顕著に容易なものにした。特にリアルタイムPCRは、PCR産物濃度をそれぞれのサイクルで観察できるようになったことで、定量的PCRの容易さ、精度、正確さが非常に改善されてきた。本発明の具体的な例では、PCR反応は高速温度サイクラーと蛍光検出器を兼ね備えたリアルタイムPCR機器であるLightCycler (Roche Diagnostics社の商標)を用いて行われている。この機器を用いることによりPCR産物は蛍光で検出されるので、サンプルの加工、膜アレイ、ゲル、キャピラリー、分析機器などは必要でない。この分野では既に知られている他のPCR機器については、本発明を実施する際用いられるかもしれない。

#### 【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、核酸定量キットおよびサンプル中に最初に含まれる標的核酸の濃度またはマスフラクションを決定する方法を目的とする。特に本発明は、サンプル中の標的核酸配列のコピー数を決定するためにリアルタイムでPCR反応をモニターするための、リアルタイム競合的ポリメラーゼ鎖反応(PCR)および蛍光ラベルオリゴヌクレオチドプローブの使用に関する。生物学的サンプル中に存在する標的核酸のコピー数を決定する方法は、少なくとも一部の生物学的サンプル、熱耐性ポリメラーゼ、既知濃度の競合核酸配列、1組のオリゴヌクレオチドPCRプライマー、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドプローブを1つの反応容器に入れ、PCR反応を開始し、反応のリアルタイム観測および/または融解曲線解析を行うという複数のステップからなる。

#### 【0016】

【課題を解決するための手段】具体的な例では、競合核酸配列の内部に位置する固有の部位を例外として、競合核酸配列を標的遺伝子と同じ配列をもつように準備する。その固有の部位は、標的核酸配列に相当する部分と



同じ核酸組成を持つが本質的に異なる配列を持つ。本質的に異なるという言葉はここでは、競合物のその特異な部分に相補的なプローブが、PCRを行うために用いられる反応条件においてバックグラウンドレベルより高く標的塩基配列の対応する領域にクロスハイブリダイズしないということ意味するために使用される。ある具体例では、その特異な領域は標的核酸配列の相当する領域に比べランダムに並べられた配列を持つ。

【0017】別の具体例では、競合物の核酸配列中のその固有の部位が点突然変異のように標的核酸配列と1塩基対だけ異なる。さらに別の例では、競合物の核酸配列のその固有の部位は、標的の相当する配列に比べ長さや組成が全く異なるが、競合物と標的核酸配列はほとんど同じ効率で増幅されるようになっている。そのような増幅効率は、CG含量と実験の繰り返しによって決定される。

【0018】アンカープローブが競合物の核酸配列のその特異な領域の隣りと、競合物の核酸配列のその特異な領域に対応する標的核酸配列の隣りにハイブリダイズするように構成される。競合物プローブは競合物の核酸配列のその特異な領域にハイブリダイズするように構成され、標的プローブは競合物の核酸配列のその特異な領域に対応する標的核酸配列にハイブリダイズするように構成される。従って、アンカープローブと標的プローブと競合物プローブがそれぞれの相補的な標的核酸配列と競合物核酸配列にハイブリダイズすると、供与蛍光体と第1受容蛍光体、同様に供与蛍光体と第2受容蛍光体が共鳴エネルギー転移関係に置かれる。それゆえ、受容蛍光体からの蛍光の測定は、標的核酸配列と競合物核酸配列の相対濃度を決定するために使用されることができる。具体的には、第1蛍光体と第2蛍光体の両方が供与蛍光体からのエネルギー転移を受け取るが、2つの受容蛍光体は異なる波長の蛍光エネルギーを発する。それゆえ、標的核酸配列と競合物核酸配列の濃度は同時に計測できるのである。

【0019】さらに別の例では、シングルラベルのオリゴヌクレオチドが用いられ望ましい情報は溶解曲線解析を通して得られる。

【0020】この発明の別の局面は、競合物と標的の間のサイクルシフトを基に最初の標的核酸配列の濃度を定量する方法である。増幅効率は標的と競合物に対してほとんど等しいとすると、 $\log C_0 = \log E(\Delta n) + \log T_0$  ( $C_0$  は初の競合物の量、 $E$  は平均効率、 $\Delta n$  は標的と競合物の間のサイクルシフト、 $T_0$  は最初の標的の量) である。この等式は  $y = mx + b$  の形をとっているため、最初の競合物の濃度と競合物及び標的の間のサイクルシフトとの関係をプロットすると、傾きが効率の対数で、 $y$  軸との交差点が最初の標的の濃度の対数である直線になる。競合物の最初の濃度は様々な設定できるので、最初の標的の濃度は比較的容易に決定されるかもしれない。

【0021】DNA 定量の特に有用な応用の1つは、あらゆる与えられた臨床サンプル中の特定のウイルスのゲノム当量を決定することかもしれない。いくつかのウイルスは複製サイクルの様々な段階で病理学的効果を示すと共に、宿主細胞中のウイルスの量は感染の進行度や病気の見通しを示すものとして働く。

【0022】この発明のさらに別の局面は、試験サンプルに含まれる1つ目と2つ目の標的核酸のマスフラクションを決定する方法である。この方法は、標的核酸にハイブリダイズした指示薬の量に関連したシグナルを与えるように構成され、さらに融解温度を基に標的核酸を識別するように構成された蛍光核酸指示薬を、標的核酸に接触させるステップと、試験サンプルを蛍光照射するステップと、融解曲線を作るために蛍光変化をモニターするステップと、標的核酸のマスフラクションを決定するために熱力学に基づくシグナル加工アルゴリズムを使用するステップと、を含む。内部標準は、1つまたは複数の塩基が標的核酸配列と異なる、人工競合物または内在性対立遺伝子を用いる。既知量の内部標準をサンプルに加えた場合は、標的核酸配列の最初のコピー数はマスフラクションまたは既知量の内部標準との比から計算され得る。特にこの種の定量方法の有用な応用は、一定の地域に住む人々の対立遺伝子頻度の決定、様々な種類の細胞や組織における差次的な対立遺伝子の発現の検出、偽遺伝子のコピー数に対するコピー数の変化を用いた遺伝子の重複あるいは欠失の検出、ガン患者の縁の切り取られた組織サンプルのような混合された組織サンプル中の異なる細胞種の間での比の評価、などである。

【0023】本研究のさらなる特徴は、以下に示す現在考えられる最良の方法での研究の遂行例を実証した詳細な記述を考慮に入れば、当業者には明らかであろう。

【0024】

【発明の実施の形態】本研究によると、解析物の定量を行うことができ、その解析物には標準技術を用いて定量するには少なすぎる濃度のものも含まれる。この方法は、増幅または融解曲線解析を行う間リアルタイムでモニターすることと、標的配列の最初の濃度を計算するための内部標準の存在とを伴う競合的PCR反応を用いている。現在まで、全てのリアルタイムPCR増幅は外部標準曲線に対する相対的な定量に限定されていた。この技術は非常に有用であるが、チューブ間のPCR効率の違いに対するコントロールがない。外部標準を用いた定量の限界は、競合的定量的PCR法の項で説明された。これらの技術において、標的と同じプライマー結合領域を持つが内部の配列が異なる競合物は、未知のサンプル中に既知濃度で加えられる。しかしこの方法のリアルタイム版は実用化されていない。

【0025】本願の開示は、標的と競合物を区別し、それにより内部標準と比較することによって遺伝子の定量を可能にするリアルタイム法の使用を目的とする。この

方法は研究者に、内部標準が提供するもう一つのコントロールを与える一方、均一なリアルタイムPCR系の利益も与える。

【0026】ある実施形態によると、唯一のハイブリダイゼーションプロブ結合サイトを持つ競合物を用いたリアルタイム競合的定量的PCRを行うための方法が述べられている。競合物は、標的と競合物に対して異なった色で発色するハイブリダイゼーションプロブを用いることにより標的と区別されるだろう。

【0027】他の例では、標的と1塩基だけしか異なる競合物を用いたリアルタイム競合的定量的PCRを行うための方法が述べられている。標的と競合物は蛍光ラベルされたハイブリダイゼーションプロブが差次的に融解することにより区別される。

【0028】図1は、記述された方法に従って使用される一実施形態400の温度サイクラー (LightCycler) の例図である。図1に示されるように、空気が空気窓470から取り込まれ、大体、線472によって示された通気路に沿って流れる。それゆえ、空気の温度ひいてはサンプル・コンテナ450の温度は、中心ダクト476内にある加熱カートリッジ474および空気を経路472で動かすために設置されたファン498により調節される。ファンはシャフト496とモーター494により稼動される。ファン498は、空気を空気窓470から取り込み排出ポート478から出す。図示された実施形態では、24サンプル用コンテナ450 (2つのうちの1つが図に示されている) は、加熱カートリッジ474と中央ダクト476の周りに対称的に設置されている。サンプルコンテナ450は、回転式コンベアー480の内部にあるスリーブ452によって受け取られる。回転式コンベアー480は、シャフト486によってモーター488につながっている駆動ギア484を備えたモーター488により位置を決められる。それぞれのサンプルコンテナからの蛍光は、励起光源468および光学検出器464と466を含む光学アレイ460によって得られる。LightCyclerのさらなる詳細は、米国特許出願第08/869,275号に記載されているであろう。ここに記載された実施形態は単なる例示にすぎず、発明の技術的範囲には他の温度サイクラーの使用も含まれることは理解される。

【0029】図面の方法によると、PCRによる解析物の増幅は、まず標的核酸配列を含む生物学的サンプルをキャピラリーチューブに入れるステップと、その生物学的サンプルを最初の温度 (「アニーリング温度」) から、最初の温度より高く、例えば、最初の温度より少なくとも15度以上高い2番目の温度 (「変性温度」) に上げるステップと、その生物学的サンプルを所定時間2番目の温度に保つステップと、その生物学的サンプルを2番目の温度から少なくとも最初の温度と同じく低い温度に下げるステップと、所定の時間少なくとも最初の温度と同じく低い温度に保温されるステップと、を含む。その生物学的サンプルの温度はそれから2番目の温度に

上げられ、所定回数、温度サイクルされる。

【0030】ある実施形態では、DNA配列の増幅法はサンプルを変性温度とアニーリング温度を所定の回数繰り返す2温度法からなる。他のPCR法も、この発見の視野に入っている。例えば、PCR反応がサンプルを変性温度、アニーリング温度、伸長温度を所定の回数繰り返す3温度法を用いて行うこともできる。

【0031】具体例では、PCRは反応はリアルタイムで観察するために蛍光物質の存在下で行われる。増幅産物の産生を連続的に観察することを可能にした、標的依存的蛍光シグナルに基づいたいくつかの検出形式が開示された。例えば、Wittwerら「高速サイクルDNA増幅の連続的蛍光観察」BioTechniques, Vol. 22, No1, 130-138, 1997参照。これらの検出形式は以下のことを含むが、それらに限られているわけではない。

【0032】1. 蛍光2重鎖DNA認識物質の使用 (図2a-b参照)

通常2重鎖増幅産物の量は、解析するサンプルに元々存在する核酸量を超えるので、2重鎖DNA特異的色素が使用される。それは、2重鎖DNAに結合しさえすれば、適当な波長で励起すると、増強した蛍光を示す (図2b)。PCR反応の効率に影響を与えないSYBR<sup>TM</sup> Green Iのような色素が使用されるのが好ましい。

【0033】2. Taq Man原理 (図2c-d参照)  
増幅産物を検出するためには、1本鎖ハイブリダイゼーションプロブが用いられる。ハイブリダイゼーションプロブは蛍光物質によってラベルされ、その蛍光放出は、同じプロブ上に存在する消光物質として働く2つ目のラベルによって消光される。PCR反応のアニーリング段階の間、プロブは標的配列にハイブリダイズし (図2c)、続いてプライマーの伸長の間、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼがハイブリダイゼーションプロブを小さな小片に消化する (図2d)。適当な励起の後、蛍光放出が増幅産物の蓄積を示すものとして観察される。

【0034】3. 分子信号

Taq Manプロブと同様、分子信号オリゴヌクレオチドが蛍光物質と消光物質でラベルされ、二次構造により、お互いに近隣に位置する。標的DNAに結合すると分子内水素結合がはずれ、プロブの一端に位置する蛍光物質がプロブの逆の端に位置する消光物質から離れる。米国特許第 5,118,801号参照。

【0035】4. ハイブリダイゼーションの際増加するFRET (図2e-f参照)

この検出形式のため、2つのそれぞれ蛍光物質でラベルされたオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプロブが使用され、それらは、増幅産物の1つの鎖上に、近隣ではあるが重ならない領域にハイブリダイズすることができる。1つ目のオリゴヌクレオチドは5'末端でラベルされ、2つ目のオリゴヌクレオチドは3'末端でラベ

ルされていることが好ましい。標的DNAにハイブリダイズすると、2つの蛍光ラベルは非常に近くに接するようになり、2つの蛍光物質間での蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) が起こる (図2f)。その結果、ハイブリダイゼーションは供与体の励起と続いて起こる2つ目の受容体の発光を計測することによってモニターされる。

【0036】同様の実施形態において、1つの蛍光ラベルプローブしか使用されず、それは適当な位置にラベルされたプライマーと共に特異的FRETペアとして働く。Bernardら「内部増幅および蛍光共鳴エネルギー転移とプローブ融解曲線を用いた四葉酸メチレン還元酵素遺伝子のC677T点突然変異の検出」Anal. Biochem. 255, p.101-107 (1998)参照。

【0037】通常、開示されたハイブリダイゼーションプローブは解析物の配列と、完全に同一か完全な相補的な配列を持つ。しかし、本発明におけるプローブは、適当なハイブリダイゼーション条件で解析物とハイブリダイズできるプローブであれば、1つあるいはいくつかが対合しないものが含まれていても、本願発明の技術的範囲の中にある。いかなる場合でも、少なくとも10の連続した残基の範囲を超えて100%同一または相補的な配列であれば特に有利であることが証明されている。プローブの長さが100塩基を越えない方が、有利であることも証明されており、40塩基より少ないことが好ましい。

【0038】蛍光共鳴エネルギー転移は、2つの蛍光物質が物理的にお互い近隣に位置したときと1つの蛍光物質の発光スペクトルがもう1つの蛍光物質の励起スペクトルと重なったときに、2つの蛍光物質の間で起こる。共鳴エネルギー転移の速度は、 $(8.785E^{-5})(t^{-1})(k^2)(n^{-4})(q_D)(R^{-6})(J_{DA})$  で表され、

$t$  は受容体がないときの供与体の励起状態の継続時間

$k^2$  は供与体と受容体の間の方向要因

$n$  は間にある媒体の可視光の屈折率

$q_D$  は受容体がないときの供与体の量子効率

$R$  は受容体と供与体の間の距離 (単位はオングストローム)

$J_{DA}$  はすべての重なる波長を想定した状態での $(F_D)(e_A)(W^4)$  の積分であり、 $F_D$  は供与体のピークを標準化された蛍光スペクトル

$e_A$  は受容体1 モルあたりの吸収効率 (単位は $M^{-1}cm^{-1}$ )

$W^4$  は波長 (単位はnm)

である。

【0039】どのような供与体と受容体に対しても、50%の共鳴エネルギー転移が起こる距離が計算されることが可能であり、 $R_0$  と略される。共鳴エネルギー転移の速度は供与体と受容体の間の距離の6 番目の力に依存するので、共鳴エネルギー転移は $R$ が $R_0$  から変わるように素早く変化する。2  $R_0$  では共鳴エネルギー転移はほとんど起こらないが、0.5  $R_0$  では転移効率は他の形式

による脱励起が優勢にならない限りほぼ100%である。

【0040】蛍光ラベルされたオリゴ核酸はDNA配列の同じ鎖にハイブリダイズされるように作られており、供与蛍光物質と受容蛍光物質は0から25ヌクレオチドの範囲で離れている。0から5ヌクレオチド離れていることが好ましく、0から2ヌクレオチド離れていることが最も良い。特に好ましい供与蛍光物質と受容蛍光物質の間の空間は、約1ヌクレオチドである。

【0041】ラベルされたオリゴヌクレオチドの1つがCRプライマーとして働くとき (プローブプライマー)、2つの蛍光物質はDNA配列の逆の鎖に存在する。この実施形態のときは、供与蛍光物質と受容蛍光物質は0-15ヌクレオチド以内にあることが好ましく、4-6ヌクレオチド以内にあることがより好ましい。

【0042】蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチドが両方とも標的DNAの相補的配列にハイブリダイズしなければ、供与蛍光体と受容蛍光体の間の距離は一般的に共鳴エネルギー転移が起こるためには大きすぎる。それゆえ、ハイブリダイズしていない状態では、受容蛍光体と供与蛍光体に共鳴エネルギー転移関係は存在せず、供与蛍光体の励起は受容蛍光体の検出可能な蛍光の増加を与えない。

【0043】蛍光共鳴エネルギー転移ペアとして用いることができる蛍光ペアは当業者にはよく知られ、以下のような組み合わせを含むが、それだけには限られない。FITCとローダミン、フィコエリフスリンとCy7、FITCとCy5、FITCとCy5.5、FITCとLCRed640、FITCとLCRed705。LCRed640とLCRed705については、ヨーロッパ特許第 0567 622号に既に記載されている。

【0044】DNAの2重鎖の熱安定性は、2重鎖の長さ、CG含量、Watson-Crickの塩基ペアに依存している。Watson-Crickの塩基ペアの変化は、ミスマッチの2重鎖の長さ、ある特定のミスマッチ、ミスマッチの位置、及び近隣の塩基対に依存して温度が変化することにより2重鎖の不安定化につながる。それゆえ、標的の相補配列に対するハイブリダイゼーションプローブの同一性の割合は、ハイブリダイゼーションプローブが相補鎖から離れる (融解する) 温度に直接影響する。プローブと標的の相補配列の間の違いが大きければ大きいほど、ハイブリダイズした鎖が別れるために必要な温度は低くなる。

【0045】5. シングルラベルのオリゴヌクレオチド シングルラベルのオリゴヌクレオチドとは、蛍光ラベルを1つしか持たないオリゴ核酸である。シングルラベルのオリゴヌクレオチドは、他のいかなる蛍光物質とも共には用いられず、相補鎖に位置する塩基配列のために蛍光が変化する。2001年8月10日に出願された米国特許出願第09/927842号参照。用いられる蛍光物質や相補鎖の配列などの様々な要因に依存して、ハイブリダイゼーションにより蛍光が減少したり増加したりする。

【0046】LightCyclerのためのプローブシステム  
FRETペアの2つの蛍光物質がPCRの間に近隣にハイブリダイズすることにより共鳴エネルギー転移が起こる(図2e-f参照)ような、LightCyclerのための配列特異的のプローブシステムが、本願発明で用いられるために開発された。2つのPCRプライマーの間に、1つは供与蛍光物質で3'にラベルされ、もう1つは受容蛍光物質で5'にラベルされた、2つの隣接するハイブリダイゼーションプローブが設計された。PCRの間に産物が蓄積されるので、プローブは各サイクルのアニーリング期に隣り合ってハイブリダイズする。受容色素への蛍光エネルギー転移はハイブリダイゼーションとともに増加し、供与蛍光と受容蛍光の割合としてプロットされる。定量のために、蛍光は2温度アニーリング伸長期の終了時に各サイクル1回ずつ計測されるのが望ましい。LightCyclerのある型は、1つの供与色素としてFITC、2つの異なる受容色素としてLightCycler Red 640 (LCRed 640)およびLightCycler Red 705 (LCRed 705)を使用することによって最適条件になる。FRETオリゴヌクレオチドペアはLightCyclerとともによく使用され、ここに記した様々な例で使用されているが、他の配列特異的のプローブが使用されることもこの発明の技術的範囲内で用いられていることは理解される。

【0047】LightCyclerによるリアルタイム速度論的PCR

LightCyclerは、SYBR<sup>TM</sup> Green Iのような2本鎖DNA 結合色素とPCR反応をモニターするためのハイブリダイゼーションプローブのどちらかと共に使用できる。図3aと図3bはハイブリダイゼーションプローブを用いた時の典型的な外部標準曲線を示している。供与プローブはFITCでラベルされており、受容プローブはLCRed 640でラベルされている。データは、受容蛍光と供与蛍光の比でプロットされている。最初の標準の濃度は、 $10 \mu\text{l}$ の反応につき標的の $10^5$ から $10^1$ コピーの範囲である。

【0048】LightCyclerを用いた突然変異検出  
各サイクルに1度モニターすることで、定量のための有用な情報が得られる。温度変化の間、継続的に蛍光を観測することでさらなる情報が得られる。温度が変化している間蛍光の変化を測定することにより、プローブのハイブリダイゼーション状態を決定することができる。ハイブリダイゼーションプローブの融解は、産物の同定および突然変異の検出に対して利用される特徴的な温度で起こる。

【0049】速度論的PCRによる定量  
プローブのハイブリダイゼーションによる蛍光の温度依存性は蛍光と温度のプロットによって証明できる(図4a)。図示したプロットは1つのサンプルを45°Cから75°Cまで緩やかな温度上昇(0.2°C/秒)させる間、0.1°Cごとにモニターすることによって作製された。産物は変性され、45°Cまで急激に冷却される(10°C/秒)。低温度

において、プローブは1本鎖の産物にハイブリダイズし蛍光比(例えばLCRed 640/FITC)は上昇する。加熱している間、プローブは55°Cから65°Cの範囲で分離し、蛍光比はバックグラウンドレベルに戻る。この曲線の導関数が温度温度に関して計算され、温度に対してプロットされる(図4b)。これは、プローブの $T_m$ の付近を中心にした融解ピークを作成する。ハイブリダイゼーション温度を基にした識別は、突然変異を検出するための強力な道具である。

【0050】突然変異検出を定量と結びつけた方法  
競合的定量的PCRアッセイにおける内部標準の使用は、内部標準として使用する競合物の注意深い選択が必要である。競合的定量的PCRアッセイでの競合物と標的は、矛盾した規準を満たさなければならない。2つの核酸配列は、同じ効率で増幅されなければならないうえ、一般的にできるだけ類似していなくてはならない。しかしそれらはまた、区別できなければならないし、ヘテロ2本鎖を形成してはならないので類似してはならないのである。

【0051】標的と鋳型の間の究極的な類似は、1塩基置換である。1塩基置換が、増幅効率に顕著な効果を持つことはほとんどない。この発見のある実施形態では、1塩基突然変異のように標的と競合物が1塩基しか異ならなくても、LightCyclerを用いて区別できる。適当な条件下ではハイブリダイゼーションプローブはDNA鎖の片方しか検出しないので、増幅中のヘテロ2本鎖形成は結果に影響を与えない。

【0052】LightCyclerの開発中、リアルタイムの蛍光データを解析するためのソフトウェアが開発された。図5aは、融解曲線を図で示したものである。そのソフトウェアは、非曲線回帰を用いて融解ピークのデータをGaussian曲線に適合させるために、それぞれの曲線の下面積を計算する。このモジュールは、 $T_m$ 法を用いた定量のためのソフトウェアの基礎として働く。標的と競合物の相対的なピーク面積の比は、2つの産物の相対量を計算するために使用される。

図5bは、様々な増幅曲線を蛍光の対数とサイクル数のプロットで示したものである。それぞれの曲線について、増幅曲線の2回微分が最大値になる点、即ち増加速度において最大増加を示す点が同定される。このわずかなサイクル数は、増幅曲線の位置を記述するために使用される。バックグラウンドノイズに対して相対的に曲線位置を確定する伝統的な「閾値」法と異なり、このアプローチは曲線の形を基に増幅曲線の位置を自動的に決定できるようにする。米国特許第6,387,621号参照。このモジュールは、マルチカラー法のためのソフトウェアの基礎として働く。図5cに示すように、標的と競合物を相対量は、2つの増幅曲線の位置におけるわずかなサイクルの違いを見ることにより決定される。

【0053】速度論的PCRを内部標準と結びつけた方法

別の実施形態では、PCR反応の間、競合物/内部標準は差次的なプローブ・ハイブリダイゼーションによって標的核酸と区別される。このように、反応はモニターされ、ハイブリダイゼーションは「リアルタイムのプローブ捕獲」が起こっているかのように検出される。これにより、単に最終段階を計測することからではなく、速度論的に標的と競合物の量を決定できる。

【0054】例としての実施形態では、速度論的内部標準定量法は、標的と競合物はプローブの結合サイトしか異ならない条件で行われる。競合物プローブと標的プローブは、別の色の蛍光 (LCRed 640とLCRed 705) でラベルされる。これらのプローブは両方とも、より長波長蛍光のアンカープローブとペアになっている。標的と競合物は両方とも同時に、1サイクルに1度観測される。例えば、この実施形態で用いられるシステムの光学設計は3色であり、キャピラリーの先の中心付近の蛍光外発光を基礎にしている。キャピラリー軸に沿った内部反射全体は、シグナルの強さを10倍に増強する。励起源は、「超発光」青色光を放つダイオードである。蛍光シグナルは、520 nmと640 nmと705 nmのバンドパスフィルターを通過した後フォトダイオードから獲得される。

【0055】DNA鎖の片方がハイブリダイゼーションプローブに検出されるので、 $T_m$ 法のようにヘテロ2本鎖は気にする必要はない。外部標準を使った実験は、増幅曲線の位置の方が最後の蛍光レベルより再現性が高い。このように、この速度論的法ではサイクルごとにデータを収集するので、最初の方のサイクルからのより信頼できるデータが使用される。有利であることに、この方法は産物比を決定するために1回の観測に依存しない。そのかわり、全体の増幅曲線に対する相対的な位置が2つの産物の比を決定するために用いられる。

【0056】同じ濃度の標的と競合物を含む反応が同じ位置にある増幅曲線を与えた場合、標的と競合物の比を計算するために、標的と競合物の間の曲線の位置のシフトが用いられる。この方法を用いることで、標的と競合物の量が正確に推測できる。

#### 【0057】デルタC.T.等式決定

上記のアプローチは、いままで内部標準と共に定量するために用いられたことはなかった。それゆえ、標的と競合物の曲線の位置とそれらの相対濃度との間の、便利な、好ましくは直線の数学関係が必要である。標的と競合物が同じ効率を持つ場合、標的に対する2回微分の最大値は

$$T_{nt} = T_0 (E)^{nt}$$

で表され、 $T_{nt}$  は2回微分の最大値を与える標的の量、 $T_0$  は標的の最初の量、 $E$  は反応の平均効率、 $nt$  は2回微分の最大値のわずかなサイクル数である。同様に、競合物に対する2回微分の最大値は

$$C_{nc} = C_0 (E)^{nc}$$

で表され、 $C_{nc}$  は2回微分の最大値を与える標的の量、

$C_0$  は標的の最初の量、 $E$  は反応の平均効率、 $nc$  は2回微分の最大値のわずかなサイクル数である。

【0058】2回微分法は、絶対的な蛍光レベルでなく、増幅曲線の形に影響を受けやすい。増幅曲線の位置は、LCRed 640とLCRed 740の間でシグナル効率の違いによって有意には影響されないだろう。2回微分が最大値になる位置は、ある特定のシグナルレベルの反映ではなく、産物がある特定の量に蓄積されたことの反映である。それらの各2回微分の最大値において、標的と競合物の濃度は等しくあるべきである。それゆえ、

$$C_{nt} = T_{nt}$$

よってそれは以下の式を導く、

$$C_0 (E)^{nc} = T_0 (E)^{nt}$$

それを変形すると、

$$C_0 / T_0 = (E)^{nt} / (E)^{nc}$$

両辺に対数をとると、

$$\log(C_0 / T_0) = \log[(E)^{nt} / (E)^{nc}]$$

$$\log C_0 - \log T_0 = nt \log E - nc \log E$$

$$\log C_0 - \log T_0 = \log E (nt - nc)$$

$nt - nc$  は標的と競合物のサイクルシフトであるので、我々はそれを  $\Delta n$  と呼べるので、

$$\log C_0 - \log T_0 = \log E (\Delta n)$$

さらに変形すると

$$\log C_0 = \log E (\Delta n) + \log T_0$$

このデルタC.T.等式は、 $y = mx + b$  の形式を持つので、最初の競合物の濃度と、競合物と標的の間のサイクルシフトとをプロットすると、効率と等しい傾きを持ち最初の標的の濃度の対数と等しいy軸との交差点を持つ直線が与えられる。

#### 【0059】例1

以下の実験は、同じ濃度の最初の標的と競合物は2回微分の最大値も同じであることを確認するために行われる。

【0060】等しい濃度の精製された標的と競合物が、1反応あたり濃度を10から $10^6$ コピーの範囲で10倍ごとに分けられたもの同士が混ぜられ、PCRで35サイクル増幅された。標的と競合物のペアの全ての2回微分が最大値になる位置が比較され、同じ濃度であったら2回微分の最大値は同じであることが期待される。この実験は5回繰り返され、交差位置のゼロ相違が $\mu n$ の95%の信頼区域内であるかどうか決定するために統計学的検定が行われた。相違がゼロではないが常に一定である場合、「 $\Delta \Delta n$ 」を使用できる、すなわち2つのチャンネルの間において曲線位置の相違もいかなる系統的な相違よりも少ない。

#### 【0061】例2

以下の実験は、アッセイの有効範囲は標的濃度の両側に少なくとも1桁の大きさずつあるということを確認するために行われた。標的が競合物のどちらかが非常に多すぎる量で存在していたら、薄い濃度の方の産物が機器の

検出限界の上になる前に、濃い濃度の産物が平坦相に達してしまうであろう。LightCyclerの検出範囲は約2桁の大きさである。この検出範囲は有効範囲の上限を規定する。少なくとも1桁の大きさの差の有効範囲が最小限望まれる。

両方の産物が検出される標的と競合物の比の最大限の違いが試験される。1反応あたり $10^4$ コピーの標的が、1反応あたり $10^2$ から $10^6$ コピーの範囲の競合物と1/3対数段階で混合される。1または2桁の大きさの間の有効範囲が期待される。標的コピー数は速度論的法を用いて計算され、実際の標的濃度と比較された。この実験は5回繰り返され、計算された標的の数の正確さが決定された。

【0062】一旦標的が $10^4$ コピーであるときの競合物と標的の最大限の違いが設定されたら、次に、ある範囲の標的濃度における標的と競合物の比の最大限の違いが決定される。1反応につき $10^1$ から $10^6$ コピーの標的が、競合物と2倍、5倍、10倍、20倍と上記の実験によって決定された標的と競合物の比の最大限の違いまで混ぜられる。標的のコピー数は速度論的法を用いて計算され、実際の標的濃度と比較される。この実験は5回繰り返され、計算された標的の数の正確性が決定される。

#### 【0063】例3

以下の実験は、標的のコピー数がアッセイの正確さと精度に与える効果を決定するために行われる。PCR実験の結果が、精度と正確さについて解析される。 $10^1$ から $10^6$ の標的のそれぞれの開始コピー数について、95%の信頼区域が計算された。 $10^1$ から $10^6$ の標的の開始コピー数それぞれについて、同じ時に行った実験内および別の時に行った実験間で変化係数(%CV)を計測することによって、間アッセイと内アッセイの精度も計算される。 $10^1$ または $10^2$ コピーのときは、%CVは100%前後であると期待される。もっと高いコピー数においては、%CVは25%前後であると期待される。25%CVは、2倍の相違を容易に識別させるであろう。

#### 【0064】ソフトウェア

曲線の位置は2回微分の最大値法を用いて計算される。曲線の形に依存しシグナルの強さに関係しないこの方法は、チャンネル間でのシグナル効率の違いに対してより抵抗性があると信じられている。サイクルシフトが最初の競合物の濃度に対してプロットされ、線はデータに適合される。その1ポイント法が合理的な答えを出した場合(%CV<50)ソフトウェアもまたこの計算を支持する。

#### 例4

標的とたった1塩基しかことならない競合物を用いた、LightCyclerによるリアルタイム競合的定量的PCRの方法が以下の実験で記載されている。標的と競合物は、蛍光ラベルされたハイブリダイゼーションプローブの融解温度の違いにより区別される。

#### 【0065】実験計画

この例で定量化される標的は、ヒトHER-2/neu遺伝子で

ある。このHER-2/neu遺伝子は乳ガンの25%で増幅されており、増幅の度合い(通常2-50倍)は生存時間と関連している。図7はHER-2/neuに対するプローブの設計である。この計画では、競合物はハイブリダイゼーションプローブにCAミスマッチが存在する。プローブの中央に存在するCAミスマッチは $T_m$ を5-10°Cシフトさせるので、マッチした融解ピークとミスマッチの融解ピークを区別させるために十分である。これらのプローブのとなりに結合するプライマー(図示せず)は、Primer designer™ソフトウェア(Scientific and Educational Software社)を使用して作成された。

#### 【0066】競合物の作成

ヒトゲノムDNAから作製された野生型HER-2/neu遺伝子のPCR産物が、標的として用いられる。競合物は、ゲノムDNAからとったHER-2/neu遺伝子から、図7に示したようなGからAへの変化を含む突然変異PCRプライマーを使って作製される。PCR産物はゲルで精製され、希釈された後、再び増幅プライマーを用いて増幅される。その産物はゲルで精製され、標的と競合物として使用される。突然変異の導入は、DNAの塩基配列を決めることによって確認される。

【0067】標的と競合物の濃度は、Molecular Probe社のPicoGreen 2本鎖DNA定量アッセイ、または既に考察した限界希釈法によって決定された。

#### 【0068】プローブの合成と精製

プローブは図7に示される。アンカープローブは3' 端に蛍光ラベルされている。受容体プローブは5' 端にLightCycler Red 640でラベルされ、3' 端はリン酸によりブロックされている。プローブは既に考察した方法を用いて合成され精製された。

#### 【0069】内部標準の定量

まず、標的と競合物からのシグナル(すなわち融解ピーク面積)が、存在する標的の量と比例することを確かめた。これは最初、精製されたPCR産物で行われる。チューブあたり $10^{10}$ から $10^{12}$ コピーの野生型と競合物のHER-2/neuが、同じ濃度で混合される。プローブのアニリング温度まで急速に温度を下げた後、プローブの融解温度より15°C高い温度までゆっくりと加熱(0.2°C/秒)することにより融解ピークが得られる。蛍光は温度勾配の間0.1°Cごとに得られる。最も適合したGaussianの下面積の比は、既知の最初の標的と競合物の比1.0である。比1.0が95%信頼区域に落ちているかどうかを決定するため統計的試験が行われ、その結果標的と競合物分子の増幅効率は区別できないことが示された。

【0070】増幅され、融解曲線解析に申し使用できるPCR産物の最終量は様々な変化要因に依存しているが、使用されたプライマーの量を超えることはない。ハイブリダイゼーションプローブ反応には、典型的には0.1  $\mu$ Mから0.5  $\mu$ Mのプライマーが使用されるので、理論的にPCRによって産生される最も高い濃度の産物は0.1から0.5



$\mu\text{M}$ の間である。予備実験の段階ではあるが、融解ピーク面積による産物の量を正確に計測するためには、増幅された後産生されたPCR産物のすべての量を超える濃度のプローブが必要であることが示されている。このことは標準的なLightCyclerの光学系に問題を生じさせる。なぜなら、 $0.2\mu\text{M}$ 以上の濃度の蛍光プローブはF1チャンネルの検出レベルを超えるからである。この問題を克服するために、LightCyclerのF1光学系は、F1検出器への蛍光シグナルの移動が90%以上阻害されるように改良された。この方法により、高い濃度のプローブが使用できるようになったので、プローブ濃度はいつでも産物を超過した濃度に行える。既知の濃度の人工鋳型を用いた再構成融解実験が、過剰のプローブを用いて、この改良された器械でピーク面積を測定するように設計された。図14は、融解ピーク面積とそれぞれ $1\mu\text{M}$ ずつプローブを使用した時の $0.1$ から $0.4\mu\text{M}$ の濃度の産物の間の直線関係を示している。これらの結果は、(プライマーを $0.5\mu\text{M}$ かそれ以下の濃度で使用したときの)最終的なPCR産物はこの直線範囲内の融解ピーク面積を作り出し、定量的情報を生み出すことを示す。

【0071】融解ピーク解析による定量的有効範囲  
融解ピークの面積とPCR産物の量との間の直線関係は、伝統的なLightCycler融解解析ソフトウェアを用いた再

構成された融解実験で、2つの分子の相対量が10倍違っても、確立され得る。この技術の有効範囲を広げるため、融解曲線解析の新しい方法が融解曲線データの熱力学モデルに基づくシグナル加工(TMBSP、例6参照)を基に開発された。つまり、異なる鎖からなる二重鎖の融解曲線を持つ鎖は、それぞれの鎖に対する同じ鎖からなる二重鎖の融解曲線に関して、それらの量分画という点で定量的に述べられる。

【0072】図15は野生型(WT)と突然変異(M)の鋳型分子を20:1から1:100の範囲の入力比で混合した後、45サイクルPCR増幅し、増幅された野生型と突然変異の産物の相対量(出力比)を同定するために融解曲線解析した結果を示す。これらの結果は、融解曲線のTMBSP解析が45サイクルのPCR増幅を行うことにより100分子の中の1分子を区別できることを示す。

アッセイの精度

表1は、融解ピーク解析による定量的正確さをまとめたものである。1:50の比であれば合理的な正確さで識別ができ、1:100では小さな違いはまだ定量的に検出できるが、正確さは劣る。

【0073】

【表1】

表 1							
融解曲線解析から計算された変異型対立遺伝子と野生型対立遺伝子との割合							
変異型に対し加えた野生型の量							
	等量	2X	5X	10X	20X	50X	100X
変異型	変異型/ 野生型	変異型/ 野生型	変異型/ 野生型	変異型/ 野生型	変異型/ 野生型	変異型/ 野生型	変異型/ 野生型
比率	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差
10%	1.040 0.041						
10%	1.030 0.069	0.544 0.044	0.230 0.008	0.108 0.007	0.052 0.008		
10%	1.010 0.055	0.517 0.009	0.227 0.006	0.117 0.010	0.062 0.005	0.027 0.011	0.012 0.007
10%	0.943 0.068	0.503 0.034	0.216 0.015	0.104 0.005	0.051 0.003	0.034 0.005	0.018 0.003
10%	0.967 0.173	0.493 0.036	0.207 0.030	0.116 0.018	0.058 0.006	0.022 0.004	0.011 0.006

【0074】PCRの指数的な性質のため、反応効率の小さな違いはサイクル増加すると共に大きな効果となる。

しかし、45サイクルの増幅の後でも定量的な情報が得られるという事実は、実際に突然変異と野生型の分子の反



応効率は産物の定量性に影響するほど有意には異ならないことを示している。

#### 【0075】ソフトウェア

データを検定するために使用された現在の解析ソフトウェアは、融解曲線データを取り、融解ピークを得るために温度に関して微分し、1から3のGaussian曲線のうち融解ピークデータに最も適合するものを計算する。使用者は適合するGaussian曲線の数を入力するだけである。現用のソフトウェアは、定量のために融解データを解析することを可能にするため、さらに改良することができる。

【0076】Gaussian曲線の等式で用いられているパラメーターは、ピークの面積、ピークの中心（平均）の位置、ピークの幅（標準偏差）である。よりよい現在利用可能なソフトウェアは、これらの3つの数値が流動的であっても良い。内部標準を用いた定量のために、曲線の数はいくつとして2つであり、平均は機器の再現性の範囲内であることが知られている。曲線の面積と標準誤差だけは全く自由に流動的である必要がある。非直線回帰ソフトウェアは、使用者がそれぞれのサンプルについて標的と競合物の期待される融解温度と競合物の濃度を入力できるように改良されることが可能である。

【0077】相対的な融解ピークの面積は、HER-2/neu 標的コピー数を計算するために用いられる。使用者はそれぞれのサンプルについて競合物のコピー数を入力する。ソフトウェアはたくさんのサンプルからデータを取り、最終的な標的対競合物の比の対数と競合物の濃度の対数とをプロットする。このプロットは、傾きが-1でy切片が最初の標的の濃度の対数と等しい直線を与えるはずである。

#### 【0078】例5

以下の実験は、LightCyclerのリアルタイム蛍光PCRを使って内部標準を用いHPV 16の量を決定するために行われる。

#### DNA/オリゴヌクレオチド

ヒトパピローマウイルスDNAがPBR322にサブクローニングされる。以下のプローブおよびプライマーは、クローニング、増幅、及び検出に用いられる。

【0079】16HI13: 5'-GGGGATCCACTTCAGTATTGC-3' (SEQ ID NO. 1)

16R19: 5'-GGGAATTCATGGCTGATCCTGCAGGTAC-3' (SEQ ID NO. 2)

16HICS: 5'-GATCCTGCAGGTACCGATCGGATAGTGAGCGAGAGATAGTAGGGATGGTTTATGTAG-3' (SEQ ID NO. 3)

ISCp913/640: 5'-LC640-CTACCTATCTCTCGCTCACTATCCATC-P-3' (SEQ ID NO. 4)

16p913: 5'-LC705-ATTACATCCGTACCTCTTCCCCATT-3' (SEQ ID NO. 5)

900f16: 5'-CCATGGCTGATCCTGCAGGTA-3' (SEQ ID NO. 6)

1300r16: 5'-CCACTTCAGTATTGCCATACCC-3' (SEQ ID NO. 7)

7)

16an913: 5'-CTCGTCATCTGATATAGCATCCCCTGTTTTTTTCCA CTACAGCCTCTACATAAAACC-FITC-3' (SEQ ID NO. 8)

#### 【0080】蛍光色素

5' 端がLCRed 640でラベルされたオリゴヌクレオチド (Roche Molecular Systems社) は、オリゴヌクレオチド合成後連結される。5' 端がLCRed 705でラベルされたオリゴヌクレオチド (Roche Molecular Systems社) は、ホスホアミデートのように合成反応の間にオリゴヌクレオチドに連結される。3' 端にFITCラベルされたオリゴヌクレオチド (Operon, Inc.社) は、HPLCで精製される。

#### 【0081】反応

最初の鋳型DNAのコピー数を検出するための人工システムが、バクテリアのプラスミドに既にクローニングされていたHPV 16ゲノムDNAを使って作成された。HPV 16人工鋳型は、順向きプライマーにEcoRI制限酵素サイトを導入し、逆向きプライマーにBamHI制限酵素サイトを導入することによって作製された。PCR産物は、pUC19プラスミドに容易にクローニングされることのできるようにHPV 16プラスミドから増幅された。

【0082】同様に、内部定量標準はHPV 16を含むプラスミドDNAから変異の入ったPCRプライマーを用いて作成された。この人工配列を作成するための実験方法は図8に示した。まとめると、HPV 16のゲノムDNAを含むプラスミドDNAが、PCRプライマー900F16と1300R16を用いて増幅された。16ICSは、ランダム化したHPV 16の内部配列を含む長いプライマーである。そのDNAは、内部定量標準 (IQS) 配列を作成するためにこのプライマーを用いて増幅された。このランダム化された領域は、内部定量標準プローブ結合サイトとして働く。プライマー16R19と16HI13は、最後にpUC19プラスミドに人工配列を方向性を持ってサブクローニングできるようにEcoRIおよびBamHI制限酵素サイトを導入したものである。バックグラウンドから類似した鋳型をでないことを確認するために、HPV 16はもう一度16R19と16HI13プライマーを用いて増幅され、これによりpUC19プラスミドへの方向付けされたサブクローンが容易にされた。

#### 人工IQSとHPV 16プラスミドの作成

1  $\mu$ lあたり $10^7$ コピーのHPV 16プラスミドDNAが、96穴マイクロタイタープレートに分注された。以下の最終濃度を持つ溶液が準備された。0.1  $\mu$ M 16HI13プライマーと0.1  $\mu$ M 16R19プライマーまたは16IQSプライマー、50 mMトリリス pH8.3 (25°C)、4.0 mM塩化マグネシウム、0.25 mg/ml牛血清アルブミン、各200  $\mu$ MのdNTP、KlenTaq DNAポリメラーゼ 0.2 Units/ $\mu$ l、1:3000に希釈したSYBR GreenI (Molecular Probe社)、人工HPV 16およびIQSの増幅のための温度サイクル条件は、サンプルを変性させるための97°C30秒1サイクルを含んだ。増幅プロトコールは、90°C1秒の変性と55°C2秒のアニーリングと78°C18

秒の伸長とその後の蛍光獲得を含んだ。それぞれの温度変化のための温度変化速度は最大で20℃/秒にセットされているが、アニーリングと伸長の間は10℃/秒にセットされた。反応物は0.8%SeaKemアガロースゲル(1xトリス、ホウ酸、EDTA、臭化エチジウム)で80mAで1.5時間泳動された。反応産物はUVライトで可視化され、産物のバンドはゲルから切り出された。産物はゲルからAmicon Gel Nebulizers (Part No. 42600, Beverly, MA)によって、説明書の手順に従って精製された。精製の後、IQSの鋳型の一部は人工IQS配列を完成させるために2回目の増幅を受けた。この反応は、鋳型DNAがIQSの一部であり、プライマーが16R19と16H13であること以外は、上記と同じ条件で行われた。最終的に得られた完成型IQS配列は、バンドとして0.8%アガロースゲルから切り出され、上記と同じ方法で精製された。

【0083】精製された人工HPV 16鋳型、IQS鋳型、pUC19 DNAは、説明書の手順にしたがってEcoRIとBamHI (Boehringer Mannheim Biochemicals社)によって制限酵素消化された。消化の後、DNAは0.8%アガロースゲルからバンドとして切り出され、上記の方法で精製された。精製された鋳型DNAは、T4 DNAリガーゼ (Boehringer Mannheim Biochemicals社) を使って、消化されたpUC19 DNAと14℃で一晩結合させた。結合したDNAは、大腸菌DH5αのコンピテントセルに導入され、125 μg/mlの濃度でアンピシリンを含むLuria Broth寒天培地上にまかれた。細胞は一晩37℃に保温された。大腸菌のコロニーはピックアップされ、125 μg/mlの濃度でアンピシリンを含むLuria Broth培地で16時間培養された。プラスミドはPromega社のWizard Miniprepsによって精製された。最終生成物は5分煮沸され、DNA濃度は分光光度計でA260とA280を計測することで決定された。挿入物は900f16と1300r16プライマーを用いた増幅、あるいはpBECIQSまたはpBEC16を用いたFRETプローブの特異性によって確認された。

【0084】人工IQSとHPV 16の鋳型は、以下の全ての反応の鋳型として使用された。IQS産物とHPV 16産物を検出するための実験計画は、標的と競合物のDNAの間の違いを最小限にするという目標に基づく。IQSとHPV 16は両方とも、900f16と1300r16の1種類のプライマーセットで増幅された。1種類の蛍光ラベルされた「アンカー」プローブが、図6に示されたように、FRETが誘導した蛍光物質として検出プローブのとなりに位置するように使用された。検出プローブは、IQS産物のIQSp913またはHPV 16産物の16p913のどちらかに特異的にハイブリダイズするように設計された。IQSp913は、LightCyclerのチャンネル2で検出されることが可能であるLCRed 640でラベルされたプローブである。16p913は、LightCyclerのチャンネル3で検出されることが可能であるLCRed 705でラベルされたプローブである。この内部標準の実験計画により、2つの産物を色で区別する方法と同様に、1つの反応キュベット中で標的と競合物の両方を同時に増幅する

ことができるようになる。

図9は、内部定量標準 (IQS) とHPV 16人工鋳型の検出を示している。1種類のプライマーペア (900f16/1300r16) は、BPV 16人工鋳型を増幅するように設計されている。この同じプライマーペアは、内部定量標準配列も増幅する。人工HPV 16とIQS配列の両方に正確にマッチする58merの蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチド (16an913) は、FRETアンカーとして働く。さらに、HPV 16配列を特異的に検出するプローブ (16p913) とIQS配列を特異的に検出するプローブ (IQSp913) の2種類のプローブが設計された。

#### 【0085】定量分析のための増幅

pBECIQSプラスミドとpBEC16プラスミドの連続的な希釈物が作られた。DNA鋳型は、96穴マイクロタイタープレートに分注され、混合された。定量のための試薬混合物は最終濃度が以下のように作製された。0.4 μM 900f16プライマー、0.1 μM 1300r16プライマー、0.3 μM 16an913蛍光プローブ、それぞれ0.1 μM 16an913 LCRed705およびIQSp913 LCRed 640プローブ、50 mMトリスpH8.3 (25℃)、3.25 μM塩化マグネシウム、0.25 mg/ml 牛血清アルブミン、各200 μMのdNTP、Taq DNAポリメラーゼ 0.2ユニット/μl、内部定量標準およびHPV 16 DNA鋳型を増幅するための温度サイクルの条件は、サンプルを変性させるための97℃30秒1サイクルを含む。増幅プロトコールは、92℃1秒の変性と47℃のアニーリングと5℃6秒の蛍光獲得と78℃12秒の伸長を50サイクルすることを含んだ。温度の変化速度は、最大20℃/秒にセットされたが、アニーリングと蛍光獲得の間の温度変化は0.4℃/秒にセットされた。

#### 【0086】結果

既にデルタC.T.等式の変形の中で示したように、標的と内部定量標準DNAは両方とも検出効率ที่等しいであろう。事実、これがこのシステムにあっていのかどうかを決定するために、両方のプローブが存在し、1つのDNA鋳型だけ検出のために利用可能である反応中で、HPV 16かIQSかどちらかの交差閾値が決定された。図10に示したように、標的と競合物DNAの交差閾値は類似していた。図10は、色の補正、ベースラインの引き算、ノイズバンドの設定、最後に増幅曲線が検出できるサイクル閾値の検出後の増幅曲線の交差閾値を示す。これらの反応の増幅または検出効率は試験された濃度の全範囲では直線にならなかったが、交差閾値は内部定量標準と標的DNAの両方で矛盾しなかった。

【0087】図10は内部定量標準と人工HPV 16鋳型の検出効率を示す。データは少なくとも3回の個別のデータポイントの平均値としてそれぞれ標準偏差と共に示されている。典型的な内部コントロール反応が図11aと11bに示されている。IQS鋳型の連続的な希釈物が準備された (1x10<sup>9</sup>、5x10<sup>8</sup>、1x10<sup>8</sup>、5x10<sup>7</sup>、... 1x10<sup>3</sup>)、それぞれのサンプルがHPV16の1x10<sup>6</sup>の開始コピー数の標

的DNAを含み、競合物IQSDNAの連続的な希釈物の1つが加えられている。最初の標準はチャンネル2で検出され

( 図11a )、IQSの減少する濃度は、最初の鋳型コピー数が減少するにつれ、典型的な交差閾値サイクルがシフトすることを示す。図11bには、HPV 16のDNAがチャンネル3で検出されるように示されている。最初の鋳型DNAの1種類の濃度 $1 \times 10^6$ から期待されるように、検出のサイクル閾値は28サイクルで一致している。図11aと11bのデータは、色彩補正ファイルを用いて、チャンネル2からチャンネル3にかぶってくる色を補正してある。

【0088】異なる開始コピー数の標的DNAと競合物DNAが存在するとき増幅時におこるサイクルシフトは、片方の鋳型DNAが単一の開始コピー数でありもう片方の鋳型の開始コピー数が変化する反応においては、普通に観測される。図12a-cに、典型的なサイクルシフトの例が示される。3つの反応が示される。それぞれの反応は、IQSとHPV 16の増幅と検出のための鋳型とプローブを含む。内部定量標準(三角)とHPV 16(四角)が、濃度を変え混ぜられている。それぞれの場合で、HPV 16は最初の鋳型濃度が $1 \times 10^4$ である。内部定量標準は、最初の濃度が $1 \times 10^5$ (図12a)、次が $1 \times 10^4$ (図12b)、最後が $1 \times 10^3$ (図12c)である。それによると、IQSのDNAコピー数はHPV 16の10倍(図12a)から1/10(図12c)の範囲である。図12bに見られるように、標的と競合物DNAの最初のコピー数が等しければ交差閾値は同一である。しかし、競合物が10倍多かったり(図12a)または1x10倍少なかったり(図12c)すると、内部定量標準のサイクル閾値はHPV 16のサイクル閾値に比べて、それぞれ早まったり遅れたりする。

【0089】競合物DNA (IQS) と標的DNA (HPV 16) の

間のコピー数の違いによるサイクルシフトは、チャンネル2で検出されるIQSとチャンネル3で検出されるHPV 16の間のサイクル閾値の変化と、反応の最初のコピー数のIQSの対数とでプロットされる。図13は、標的であるHPV 16に対して1回の実験でそれぞれのDNA濃度につき3回ずつ測定を行う実験を2回個別に行ったデータを示す。HPV 16の最初の鋳型濃度は、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ である。エラーバーは、4つの独立したデータポイントから計算した標準偏差から決定された。それゆえ、標準偏差は同じ時に行った実験および別の時に行った実験の両方から算出されている。サイクル閾値エラーのほとんどは、別の時に行った実験のデータから派生している。プロットされた直線は、それぞれのIQSとHPV 16の濃度における平均のデルタC.T.のデータポイントの平均値の傾向を示している。それぞれの濃度のIQSと $1 \times 10^4$ の濃度のHPV 16における平均デルタC.T.データポイントの平均値の傾向を示す直線が、図13に示されている。傾向を示す直線は、ポイントに適合する最も良い直線を少なくとも4回解析することによって計算されている。表2は、傾向を示す直線に合う直線に対する数式を示している。

【0090】内部定量標準曲線からのデルタC.T.データの解析が、表2に示されている。標的の濃度を計算するために使用された傾向を示す直線の数式は、太字で示した $\log[T_0]$ を用いて示されている。増幅効率、HPV 16標的DNAの実際の濃度および計算された濃度も示されている。

【0091】

【表2】

表 2 図8のデータに対して最良に直線で結んだトレンドライン				
トレンドライン等式 $\log Co = \log E (@ n) + \log T_0$	効率	計算された $Co$ -数	実際の $Co$ -数	%エラー
$y = 0.2802x + 5.9347$ $R^2 = 0.989$	1.91	$0.86 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	13.96
$y = 0.2872x + 4.9235$ $R^2 = 0.9911$	1.94	$0.84 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	16.16
$y = 0.2826x + 3.9527$ $R^2 = 0.988$	1.92	$0.90 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	10.32
$y = 0.2944x + 2.9621$ $R^2 = 0.9885$	1.97	$0.92 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	8.36
$y = 0.289x + 1.8822$ $R^2 = 0.9922$	1.95	$0.76 \times 10^2$	$1 \times 10^2$	23.76
観測されたコピー数と計算されたコピー数の間の絶対値の差が、各特定の初期標的のコピー数に対し%エラーとして表されている。				

【0092】これらの直線のそれぞれの傾きの対数は、

平均反応効率を出すために計算され、y切片の対数は観

察された標的DNAの濃度を計算するために使用された。それぞれのサンプルにおいてDNA濃度を限定希釈決定し、それにより算出したそれぞれの反応における最初の鋳型コピー数に基づき推測される濃度と比べて、観察された標的濃度は、24%以上の違いはなかった。

【0093】類似した鋳型を増幅するために用いられた共通のプライマーセットの使用と、それらの鋳型の産物を検出するための2つのハイブリダイゼーションプローブ系は、明らかに類似した交差閾値を持つサンプルを見いだした。内部定量標準へのこの2色検出システムの適用は、標的DNA濃度の両側の10倍の最小限の有効範囲で内部定量を導き出すための交差閾値データに簡単な操作するだけの数式を変化させることにより、簡便化された。

【0094】上記の例はFRETオリゴヌクレオチドプローブ系を組み込んだが、この発明の技術的範囲には他のプローブシステムも使用されてよいことは理解される。例えば、シングルラベルのオリゴヌクレオチドプローブが使用されてもよいが、その場合アンカープローブの必要性が消失する。以下の例では、FRETオリゴヌクレオチドプローブ系（センサーと受容体）とシングルラベルプローブシステム（センサープローブのみ）の両方を使用している。

#### 【0095】例6

この例は、混合物の中で異なる核酸標的の割合が熱力学モデルに基づくシグナル加工アルゴリズムを用いて定量化できることを説明する。典型的な2対立遺伝子システムでは、このアルゴリズムを使って対立遺伝子分画を100の中のものまで正確に決定できる。この方法は、例えば遺伝子発現の対立遺伝子パターン、プールされた人口における対立遺伝子頻度、混合された組織サンプルの異なる細胞タイプの割合などを求めるときに使用されることができ。

#### 【0096】2対立遺伝子システムのモデル

ヒトp53遺伝子のシングルヌクレオチド多型性（SNP）遺伝子座（GenBank Accession #U94788）が、標的として用いられる。SNP遺伝子座の検出と解析は、3'蛍光ラベルセンサープローブ（5' GTT CCT GCAT GGG CGG CAT GAAC -F (SEQ ID NO.9)）を使用することにより可能である。野生型標的配列に完全にマッチしたときは、このプローブの $T_m$ は70°Cである。突然変異対立遺伝子にハイブリダイズしたときは、プローブの5'端から12番目の位置でGAミスマッチが生じることによりプローブの $T_m$ は62°Cにシフトする。

【0097】このセンサープローブは、標的鎖のG残基の効果によりハイブリダイズするとプローブのシグナルが減少する蛍光消光機構（Crockett and Wittwer, Anal Biochem. 2001, 290(1):89-97参照）により単独でSNP遺伝子座を検出するために使用されることができ。シグナルの変化が、LightCyclerのF1チャンネルに観測さ

れる。実例では、このプローブは蛍光共鳴エネルギー受容色素として5'端にLCRed 640でラベルされた受容プローブ（5' 640-GGAGGCCCATCTCACCATCATCACTGGAAC (SEQ ID NO.10),  $T_m$ =75°C）とペアにされることもできる。このFRETペアプローブシステムによるシグナル変化は、F2チャンネルで観測される。

#### 【0098】標的の調整

野生型と突然変異遺伝子座の標的は、順向きプライマー5' GCGCACTGGCCTCATCTT (SEQ ID NO. 11) ( $T_m$ =62.9°C) と逆向きプライマー5' GGT CAG CGG CAAG CAGA (SEQ ID NO. 12) ( $T_m$ =62.6°C)を用いたPCRによって作製された。増幅されたサンプルは精製され、分光高度計で定量され、様々な既知のモル比で混合された。

#### 【0099】融解曲線解析

反応混合物は、DNA (2000コピー/10  $\mu$ l)、KlenTaq酵素 (0.8 U/10  $\mu$ l)、TaqStart抗体 (0.088  $\mu$ g/10  $\mu$ l)、0.2 mM dNTP、3 mMマグネシウムイオンを含む1xPCRバッファー (Idaho Technology Inc., UT)、0.2  $\mu$ Mアンカープローブおよび/またはセンサープローブからなる。例4と異なり、この系のヘテロ接合体サンプルは約1の融解ピーク面積比を与えるので、大量のプローブを使用する必要はない。温度サイクルの条件は、94°C（移行速度は20°C/秒、0秒間保持）、56°C（移行速度は20°C/秒、5秒間保持）、74°C（移行速度は2°C/秒、7秒間保持）。40サイクルした後、94°Cでサンプルを変性し40°Cでアニリングし温度移行速度0.2°C/秒で2本鎖DNAを融解することにより融解曲線解析が行われる。融解の間、蛍光は継続的に観測される。その結果できた融解曲線データ（図16aと16cに対立遺伝子比50:50の例、図17aと17cに対立遺伝子比95:5の例を示す）は、熱力学モデルに基づくシグナル加工（TMBS）ソフトウェアで直接解析され、対立遺伝子比が推測される。2つの外部標準（100%野生型対立遺伝子と100%突然変異対立遺伝子）がTMBS解析法のために与えられる。ピーク面積比法を用いて対立遺伝子分画を推測するために、最初に融解曲線データは負の1回微分をとることにより融解ピークデータ（図16bと16dに対立遺伝子比50:50の例、図17bと17dに対立遺伝子比95:5の例を示す）に変換される。その後、そのデータは例4に記載したようにLCDAソフトウェア（Roche Molecular Biochemicals社）のようなソフトウェアを用いて解析される。

#### 【0100】熱力学モデルに基づくシグナル加工（TMBS）アルゴリズム

アルゴリズムは、デジタルシグナル加工と混合物の中の物質のマスフラクションを計算するための熱力学観測を結びつける。デジタルシグナル加工は、高速フーリエ変換を使用するとともに小振幅フーリエモードとシグナル中のノイズを連結することにより行われる。熱力学モデルはGibbsの混合物自由エネルギーに基づいており、融解した物質の中では化学的相互作用はないと仮定する。

さらに、アルゴリズムは標準値がなくても混合サンプルの融解シグナルを解析する能力を持っている。この方法により、融解温度と未知の物質の分画がわかる。

【0101】以前の技術は例示した方法と4つの違いがある。まず、ほとんどの技術はたくさんの異なる種類の物質から出るシグナルから個別の物質を同定するために、フーリエに基づいた脱回旋を用いてシグナル加工を行う。これらの方法は、入力シグナルは予め決定された回旋中心を用いた個々のシグナルの回旋であると仮定する。この種のの方法の例は、米国特許第 5,273,632,5,748,492号と第5,346,306号にある。本願開示の例示方法は、物質のマスフラクションを決定するための物質として脱回旋中心を決定する。

【0102】2つ目に、以前の技術は一度に1つしか目的の物質の量を決定できない。一度シグナルの物質が決定されたら、これらの方法はシグナルから結論を引き出し、その後次の物質を決定する。この種のの方法の例は、米国特許第 5,985,120号にある。本願開示の方法は「一度に全て」のアプローチでマスフラクションを決定する。

【0103】3つ目に、デジタルシグナル処理を用いた以前の技術は、米国特許第 5,906,919号、第5,912,165号、第6,066,459号、第6,054,268号にあるように電気泳動かそれに類似した方法で、PCRで増幅したサンプルを映像にしたものを解析するか、または米国特許第 6,054,268号または第6,268,131号のようにマススペクトロメーターを使用していた。本発明の方法では、PCRサンプルを増幅した後操作する必要はない。

【0104】4つ目に、米国特許第 6,221,600号のようなPCRをもとにした応用にデジタルシグナル加工を使用した以前の技術は、熱力学モデルを使用しない。

【0105】本発明は、目的物質のパラメーターのセットの決定を、同時に行われる光学シグナル加工計画の決定の加工と結びつける。

【0106】個別フーリエ変換(DFT)を用いたデジタルシグナル加工は、高速フーリエ変換(FFT)が発見されて以来広く用いられてきた。基本的な考えは、シグナルを正弦曲線シグナル(または基底関数)との一次結合として示すことであり、またシグナルについて信頼できる情報を含むそれらの正弦曲線基底関数を保持することである。

【0107】DFTは、周期的な関数に近似させるためにフーリエ級数から有限数の文字を用いる。フーリエ級数は、合理的な量のなめらかさで周期的な関数を表す。蛍光融解シグナルを $f(T)$ と考えると、 $f(T)$ のフーリエ級数は

【0108】

【式1】

$$f(\tau) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} g(k) e^{2\pi i k \tau}$$

ここで、温度が変数の変化により再び測定され

【0109】

【式2】

$$\tau = \frac{T - T_{\min}}{T_{\max} - T_{\min}}$$

変数 $g(k)$ は $f(T)$ の個別フーリエ係数である。それぞれの計数 $g(k)$ は積分をコンピューターで計算することにより算出され

【0110】

【式3】

$$g(k) = \frac{1}{\pi} \int_0^1 f(\tau) e^{2\pi i k \tau} d\tau$$

そして、FFTは、これらの積分のセットをコンピューターで計算するのに効果的な方法である。

【0111】実際には、これらの文字の有限数だけがコンピューターで計算され、いくつかの文字はシグナル中のノイズを表しているのて意味がない。DFTは、ノイズをゼロにするこれらの個別フーリエ係数をセットすることによりシグナルからノイズを消去する簡単な方法を与える。どちらがノイズに相当する係数で、どちらがシグナルに相当するかは、決定されないままである。

【0112】数学的公理はこれを遂行するために役に立つ。個別フーリエ係数の対数係数の和は、関数 $f(T)$ の平均または

【0113】

【式4】

$$\|f(\tau)\|^2 = \sum_{k=-\infty}^{\infty} |g(k)|^2$$

に等しい。

【0114】シグナル中のノイズは小さいと仮定すると、ノイズを消去する共通で安全な方法は、この特性を使いDFTの数字を十分に保持することである。すると、実際のシグナルの平均と加工されたシグナルがお互いに近接する。特に、 $\sigma$ が小さな同調パラメーターで、もし $|g(k)| < \sigma$ であったら $g(k)=0$ にセットする。もし $K(\sigma)$ がゼロにセットされていない個別フーリエ係数のセットであったら、加工シグナルは

【0115】

【式5】

$$f^{\sigma}(\tau) = \sum_{k \in K(\sigma)} g(k) e^{2\pi i k \tau}$$

であり、それは加工されたシグナルが実際のシグナルと近接しているという特性をもつ。なぜなら

【0116】

【式6】

$$\|f(\tau) - \sum_{k \in K(\sigma)} g(k) e^{2\pi i k \tau}\|$$

は構造により、小さいからである。さらに、実際のシグナルに小さな量しか与えない周期基底関数は無視される。通常これらの基底関数は高速で振動しており、ノイズとして同定される。この方法はさらに、実際のシグナルとデータの小さなセットを近似する利点がある。保存しておかなければならないデータは、セットされた $K(\sigma)$ の波の数と、一致する個別フーリエ係数だけである。

【0117】熱力学モデル

PCR産物の蛍光シグナルは、産物が変性すると減少したり増加したりする。この過程は、熱力学を用いて理解される相変移である。混合物質の相変移の熱力学は、基本物質の相変移の熱力学に基づいている。

【0118】1, 2, ..., Nでラベルされた、多くの物質の混合物を考える。もし $G_i(T)$ が温度の関数として物質 $i$ のGibbsの自由エネルギーであるとしたら、これらの物質の混合物のGibbsの自由エネルギーは

【0119】

【式7】

$$G_{mix} = \sum_i m_i G_i(T) + \sum_{i>j} \Delta G_{mix,ij}$$

で与えられ、 $m_i$ は物質 $i$ のマスフラクションである。攪拌によるエネルギーは $\Delta G_{mix}$ であり、それは物質 $i$ と $j$ を混合したことにより導入されたエントロピーの変化を説明する。水溶液中では、この数字は通常小さい。

【0120】蛍光融解シグナルは、物質のGibbsの自由エネルギーを測定しない。しかし、温度の関数としてシグナルは単調に変化するので、温度自体が、蛍光の関数、即ち $T(f)$ で $f$ は蛍光融解シグナルとして考えることができる。

【0121】 $G_i(T)$ は典型的に、特に相変移に近い温度では、温度の単調な関数であるので、これは役に立つ観察である。温度は $f$ の関数であるので、 $T(f)$ で $G_i(T)$ を構成することは $G_i$ が蛍光の関数であることを示唆する。最

$$f'(T) = P_1(T) \left( 1 - \sum_j m_j M_j(T) \right) + P_2(T) \sum_j m_j M_j(T)$$

モデル中で使用される数は以下のように規定される。

- ・  $T$ -温度
- ・  $f'(T)$  -融解曲線の近似された蛍光
- ・  $P_1(T)$  -アニーリング相での蛍光を示す非直線関数
- ・  $P_2(T)$  -融解相での蛍光を示す直線多項式
- ・  $M_j(T)$  -融解した種 $j$ の画分； $M_j(T)=0$ は種 $j$ がアニーリングしたことを示し、 $T_j$ は融解温度
- ・  $m_j$ -サンプルの入った入れ物の中の種 $j$ の持続的なマスフラクション

【0129】最終的に、それぞれの融解が1つずつの文

後に、 $G_i$ は単調な関数であるので、蛍光は $G_i$ の関数であると考えることができる。

【0122】これらの観察からPCR混合物の蛍光は

【0123】

【式8】

$$f_{mix} = \sum_i m_i f_i(T) + \sum_{i>j} \Delta f_{mix,ij}$$

という式をモデルにすることができることが示唆される。ここで、 $f_i$ は種 $i$ の蛍光融解シグナル、 $f_{mix}$ は種 $i$ と $j$ の混合物の蛍光融解シグナルである。

【0124】蛍光融解シグナル $f_i$ と $f_{mix}$ が与えられ、蛍光混合数を無視することで、 $m_i$ に対して0と1の間のどの値をとったとしても以下の目的関数を最小限にすることにより物質のマスフラクションの良い近似値が得られる。

【0125】

【式9】

$$\int_0^1 \left\| f_{mix} - \sum_i m_i f_i(T) \right\| dT$$

【0126】基底関数近似

解析される蛍光融解シグナルは、上記の $f_i$ のような標準融解シグナルを持つかもしれないし持たないかもしれない。標準シグナルがないときは、標準シグナルの近似値が求められなければならない。例示する近似スキームは、産物の蛍光融解シグナルが融解変移より高い温度（すなわち「融解相」）では本質的に直線であり、融解変移より低い温度（すなわち「アニーリング相」、図20参照）では本質的に非直線であるという観察に基づいている。

【0127】標準シグナルに近似するためには、全てのPCR混合物の蛍光融解シグナルはある合理的なシグナルに相対的に測定され、残りのデータの近似値が計算される。使用される数学モデルは

【0128】

【式10】

字で表され、モデル中の全ての数は $N$ で示される文字を含むことになる。

【0130】観察された反応と初歩熱力学の組み合わせを用いて、モデルがたてられた。 $P_j(T)$ というバックグラウンドの文字は単にデータと共に経験に基づいているが、分数の融解等式の直線結合は、物質の混合物の自由エネルギーに基づいている。自由エネルギーは、最初の希望通り混合物の物質の自由エネルギーの総和である。物質の自由エネルギーの変化はプローブ融解実験の相変移の推進力となるので、サンプルの蛍光は個々の物質の蛍光の直線結合に近いことが期待される。この前後関係

でいえば、 $M_j(T)$ という数字はおそらく $j$ に対するプローブが標的に結合しているであろうことを示している。融解数 $M_j(T)$ は、融解変移の時最も急な曲線を示す融解温度 $T_j$ と融解変位の幅 $w_j$ の2つのパラメーターに依存している。

#### 【0131】アルゴリズム連結

完全なアルゴリズムの前段階における最初の段階で測定が行われ、融解シグナルのないサンプル（「ネガティ

ブ」）が見つかる。そして、残りの関数を特定するパラメーターが見つかる。最後に、反復処理が一度に残りを加え、なめらかにするパラメーター $\sigma$ 、既知標準のマスフラクション $m_i$ 、残りの関数 $T_j$ と $m_j$ の融解温度とマスフラクションのパラメーターを同時に見つけるために目的関数を最小化する。

#### 【0132】

#### 【式11】

$$\min_{m_i, \sigma} E(m_i, \sigma, T_j) = \int_{T_0}^{T_1} \left\| f_{m_i}^{\sigma} - \sum_i m_i f_i^{\sigma}(T) - f'(T) \right\|^2 dT$$

反復過程は、 $\epsilon$ を許容誤差としたときマスフラクションの和が $1-\epsilon$ より大きくなったとき、混合物質の近似融解シグナルが $f_{mix}$ に十分近づいたときに停止する。以前の連結結果は、目的関数を最小化する最適化ソフトウェアに入力するための入力として用いられる。アルゴリズムで用いられる許容誤差制限 $\epsilon$ は、シグナル中のノイズの相対的な大きさに比例する。別の許容誤差を選別する方法も使用可能である。

【0133】アルゴリズム処理の全行程のフローチャートが、図18に示されている一番上の欄はアルゴリズムへの入り口であり、使用者は標準と未知の物質を指定する。2つ目の欄では、全てのシグナルの計測因子が決定され、どのシグナルがネガティブであるかが決定される。3つ目の欄では、残りの因子のパラメーターが決定される。もし標準の連結が未知の融解曲線に対して適するモデルであったら、残りのパラメーターはゼロになる。既知標準 $f_i$ がない場合、近似曲線 $f$ がもっぱら使用される。

【0134】下の3つの欄は、全ての未知の物質を見つけるための反復アルゴリズムを形成している。1つ目の欄では、この項で定義された最小限化の問題が一般に用いられている標準と残りのものを組み合わせることによって解決されている。そしてそのモデルは未知のもの

と比較され、その組み合わせが許容誤差制限内であったらアルゴリズムは停止し、その結果を報告する。その組み合わせが許容誤差制限を越えていたらアルゴリズムは新しい標準を決定し、問題を最小限にする解決案を報告する。

#### 【0135】結果

野生型対立遺伝子分画は、(1)熱力学に基づいたシグナル加工(TMBSP)法と(2)LCDAソフトウェアを用いた融解ピーク面積比解析法を用いて（「出力」として）推測される。表3と4において、それらの出力はサンプルの中の実際の対立遺伝子分画（「入力」）と比較されている。TMBSP解析の出力は、用いられたプローブシステムとは関係なく、全ての対立遺伝子分画に対して得られる。その値は、入力値とよく合致した。融解ピーク面積比解析の出力は、遺伝子分画が10%以上90%以下の条件でFRETベアプローブを用いたときのみ得られる（表3）。センサープローブのみを用いると融解曲線データに逆方向のシグナル変化が起こる（図16b、17b）ので、この解析に使用されるLCDAソフトウェアは融解ピーク面積比を出せなかった。LCDAソフトウェアは、遺伝子座分画が10%以下90%上でも検出できなかった。

#### 【0136】

#### 【表3】

表 3 センサープローブのみを用いて得られたデータ		
野生型対立遺伝子の入力分画 (%)	融解ピーク面積比の解析の出力 (%)	TMBSP解析の出力 (%)
2	—	2
5	—	5
10	—	11
20	—	20
50	—	49
80	—	78
90	—	85
95	—	92
98	—	94

【表4】



表 4 FRETペア (センサーと受容体) プローブを用いて得られたデータ		
野生型対立遺伝子の 入力画分 (%)	融解ピーク面積比 の解析の出力 (%)	TMBSP解析 の出力 (%)
2	—	3
5	—	7
10	7	14
25	16	24
33	29	34
40	33	39
50	47	52
60	56	61
66	67	70
80	78	80
90	—	87
95	—	92
98	—	95

【0137】出力値と入力値の間の違いが、入力値に対してプロットされる (図19)。違いにおいてゼロは、出力値と入力値が完全に一致することを示す。TMBSP法を用いた出力値と入力値の間の違いは、平均-0.15 (標準偏差=2.4) であり95%の信頼区域はゼロを含む。これはTMBSPアルゴリズムによって得られた推測は高い正確性を持つことを示す。融解ピーク面積比解析を用いた出力値と入力値の間の違いは平均-4.2 (標準偏差=2.9) である。95%の信頼範囲はゼロを含まない。これは、融解ピーク面積比法は統計的偏りがあることを示す。

#### 【0138】例7

この例は、混合物中の遺伝子量は熱力学モデルに基づいたシグナル加工 (TMBSP) アルゴリズムを用いて定量できることを説明する。典型的な系では、目的の遺伝子座はPCRの前に既知量の増幅されない競合物を加えることにより、欠失や重複がおこっていないかを調べる。PCRの後、野生型サンプルで遺伝子座と競合物の間の遺伝子量比が、アルゴリズムを用いて未知のサンプルにおける比に対して比較される。例えば、ガン抑制遺伝子でエクソンにおこった欠失と重複が存在することが知られており、それらは乳ガン、胆嚢ガン、遺伝性ポリープ症直腸ガンを含む様々な腫瘍に重要であると考えられているが、これらの長い欠失や重複は典型的な解析法の限界により困難であった。

【0139】PCRプライマーは、目的の遺伝子座の断片を選択的に増幅する。典型的には、断片は100 bpから200 bpであるが、それより長くても短くてもよい。例えばハイブリダイゼーションプローブのセットまたはシングルラベルのプローブのような配列特異的プローブ系は、増幅された断片の一部に対する相補的配列が与えられている。実例では、この断片はシングルヌクレオチド多型性が知られている部位は避けられる。さらに、1本鎖競合物ポリヌクレオチドが与えられる。一般的にプローブに相補的であるが1つまたは多数のミスマッチが存在するものもある。この競合物鎖は実例として増幅された断

片より短く、典型的には50から60塩基対であり、プライマーがハイブリダイゼーションする領域は欠けているので競合物はPCR中増幅されることはない。また、競合物の3' 端はリン酸化されているので、自身がプライマーとして働くことが抑制される。典型的なレポータープローブは17から19塩基対の長さであり、競合物鎖の1塩基のミスマッチおよび/または1塩基の欠失は融解温度 ( $T_m$ ) を10から12°Cシフトさせる。そのような競合物配列の変化により、競合物と興味のある標的は異なる  $T_m$  を持つようになる。または、競合物に完全にマッチした (標的にはミスマッチを持つ) プローブを作成する方法もある。

【0140】実例では、0.1から0.2  $\mu$ Mのプライマーと増幅に必要な他の試薬を含む10  $\mu$ LのPCR混合物中に存在する10 ngのヒトゲノムDNAに対して、1  $\mu$ Mの競合物が加えられる。

【0141】PCRの後、同じ既知量の競合物を含むサンプルについて融解曲線解析が行われた。典型的には、指数相において融解曲線解析を開始する必要はない。PCRが40から45サイクルした後産生されたPCR増幅物質は、平坦相において正確なデータを与える。2段階の標準が用いられる。1段階目は、1) 競合物なしの野生型サンプルと2) 競合物自身からなる。2段階目は、競合物と混合された野生型サンプルからなる。1段階目の標準融解曲線から、TMBSPアルゴリズムは混合された野生型標準の中の遺伝子座と競合物の比をコンピューターで計算する。その後、未知のサンプルは類似した方法で解析され、野生型においての比で標準化される。野生型であるサンプルは標準化された比1を持つ。片方の染色体で目的の対立遺伝子が欠失している (しかしもう片方は欠失していない) サンプルは、標準化された比0.5を持つ。片方の遺伝子座が1回の重複を持つサンプルは、標準化された比1.5を持つ。

#### 【0142】例8

例7の典型的な系は、PCRの前にサンプルDNAの量が調節できないような状況に適応できるように、さらに改良さ

れる。サンプルのDNA量を標準化するために、ハウスキーピング遺伝子を用いる方法がよく知られている。1つ目のプローブセットと異なる蛍光色素でラベルされていることが好ましいハウスキーピング遺伝子に対する2つ目のプローブセットと1つ目の競合物と全く同じ量のハウスキーピング遺伝子に対する2つ目の競合物が、サンプルに加えられる。または、1つ目と2つ目の競合物の配列を持つキメラ競合物が、2つの競合物配列の遺伝子量が等しいことを確認するために用いられる。ハウスキーピング遺伝子と競合物の比は全てのサンプルでアルゴリズムを使用して計算され、遺伝子座の量を標準化するために用いられる。

#### 【0143】例9

例7で記述した系は、さらに基底関数近似アルゴリズム（詳細は例6）を用いることによってより単純化される。この場合、標準融解曲線は1つしか必要ではない。近似アルゴリズムは競合物と混合された野生型サンプルの融解曲線を取り、曲線を2つの標準曲線（片方が遺伝子のみでもう片方が競合物のみ）に分ける。野生型サンプルの遺伝子座と競合物の比は1が割り当てられる。アルゴリズムによって得られた標準曲線は、その後TMBSPアルゴリズムを用いた未知のサンプルの比を計算するために用いられる。最終的な答えは、例7で出された答えと同じである。

#### 【0144】例10

この例は、生物学的サンプル中の2つまたはより多くの核酸のマスフラクション（またはモル比）が、増幅するための同じPCRプライマーセットや、異なる核酸に対して同じプローブセットを用いる制限がなくても、熱力学

モデルに基づくシグナル加工（TMBSP）アルゴリズムを使用することで定量できることを説明する。

【0145】ヒトHER-2/neu遺伝子とハウスキーピング遺伝子のベータアクチンの断片が、それぞれの遺伝子に対する個別のPCRを用いて増幅され、個別のプローブを用いて融解解析が行われる。プローブはLightCyclerの検出チャンネルの1つで両方の遺伝子の検出ができるように蛍光ラベルされる。プローブは2つの遺伝子が区別できるように異なる融解温度（ $T_m$ ）を持つ。例4には、LCred 640でラベルされたHER-2/neuプローブが $T_m$ が64°Cのレポータープローブとして使用されると記述されている。米国特許第 6,174,670号には、ベータアクチンプローブはCy5でラベルされたレポータープローブであり、 $T_m$ は約74°Cであると記述されている（米国特許第6,174,670号 SEQ ID NO.3とSEQ ID NO.4）。野生型標準からの融解曲線データは、まずデータを2つの分離した融解曲線に変えるために基底関数近似アルゴリズムによって解析される。その後、他のサンプルのHER-2/neuとベータアクチンの比が、野生型標準において1.0とした比を用いてTMBSPアルゴリズムによって計算される。類似したアプローチを用いた方法も考慮され、生物学的サンプルの中の2つ以上の核酸物質が定量されることが可能である。

【0146】よりよい具体例を引用することで詳細に発明を説明してきたが、この発明を変形したものや修飾したもの、以下の請求項に記述し定義したように発明の視野と意図の中に存在する。

#### 【0147】

#### SEQUENCE LISTING

<110> University of Utah Research Foundation  
Idaho Technology

<120> REAL-TIME GENE QUANTIFICATION WITH INTERNAL STANDARDS

<130> GA020591

<140>

<141>

<150> US 60/316614

<151> 2001-08-31

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Eyre, David J.

Inventor: Rasmussen, Randy P.  
Inventor: Caplin, Brian E.  
Inventor: wade, Stevenson  
Inventor: deSilva, Deepika M.

<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for cloning.  
<;400>; 1  
ggggatccac ttcagtattg c

21

<;210>; 2  
<;211>; 29  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for cloning.

<;400>; 2  
gggaattcca tggctgatcc tgcaggtac

29

<;210>; 3  
<;211>; 59  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for cloning.  
<;400>; 3  
gatcctgcag gtaccgatcg gatagtgagc gagagatagg tagggatggt tttatgtag 59

<;210>; 4  
<;211>; 27  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for detection of internal quantification standard.  
<;220>;  
<;221>; misc\_feature  
<;222>; (1)..(1)  
<;223>; 5'-LC640 Fluorescent label  
<;400>; 4  
ctacctatct ctcgctcact atccatc

27

<;210>; 5  
<;211>; 27  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for detection of artificial HPV 16 sequence.  
<;220>;  
<;221>; misc\_feature

<;222>; (1)..(1)  
<;223>; 5'-LC705 Fluorescent label  
<;400>; 5  
attacatccc gtaccctctt cccatt

27

<;210>; 6  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for cloning.  
<;400>; 6  
ccatggctga tcctgcaggt ac

22

<;210>; 7  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for cloning.  
<;400>; 7  
ccacttcagt attgccatac cc

22

<;210>; 8  
<;211>; 59  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Synthesized sequence for detection of internal quantification stan  
dard and  
artificial HPV sequence.  
<;220>;  
<;221>; misc\_feature  
<;222>; (59)..(59)  
<;223>; 3'-fluoresein Fluorescent label  
<;400>; 8  
ctcgtcatct gatatagcat cccctgtttt ttttccact acagcctcta cataaaacc 59

<;210>; 9  
<;211>; 23  
<;212>; DNA  
<;213>; Homo sapiens  
<;220>;  
<;221>; misc\_feature  
<;222>; (23)..(23)  
<;223>; 3'-fluoresein Fluorescent label  
<;400>; 9  
gttcctgcat gggcggcatg aac

23

<;210>; 10

<;211>; 33  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;220>;  
 <;221>; misc\_feature  
 <;222>; (1)..(1)  
 <;223>; 5'-LC640 Fluorescent label  
 <;400>; 10  
 ggaggcccat cctcaccatc atcacactgg aag

33

<;210>; 11  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;400>; 11  
 gcgcactggc ctcacttt

18

<;210>; 12  
 <;211>; 17  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;400>; 12  
 ggtcagcggc aagcaga

17

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】LightCycler の機械および光学設計の一例図である。

【図2】増幅産物を検出するための様々な蛍光検出法の一例図である。図2a-b は、2重鎖特異的な色素による増幅産物の検出を示す。図2c-d は、増幅産物の合成により供与光が生じるTaq Man 法を示す。図2e-f は、2つの個別にラベルされたプローブが核酸配列の近接した領域にハイブリダイズすることによって蛍光共鳴エネルギー転移がおこるハイブリダイゼーション・プローブ法を示す。

【図3】ハイブリダイゼーションのデータを用いた典型的な外部標準曲線を示す。図3a は蛍光比の対数とサイクル数のプロットである。図3b はコピー数の対数と2回微分の最大値のプロットである。

【図4】蛍光と温度の関係のプロットすることにより得られる典型的な標準曲線(図4a)と、突然変異のホモ接合体(・・・)、野生型のホモ接合体(――)、突然変異のヘテロ接合体(――)、DNA なし(――)のときの温度に対してプロットした典型的な標準曲線の微分商(図4b)である。

【図5】いくつかの核酸の融解解析を示す。図5a は、融解曲線から作られた融解ピークを示す。それぞれの曲線の下の部分の面積は、Gaussian 曲線に融解曲線のデータを適合させるために非直線回帰を使用して計算された。図5b は蛍光の対数とサイクル数のプロットについての様々な増幅曲線を示す。図5c は図5b のデータを

【式】の形式に変換したものである(実線は図5b のデータから計算した交差点を示し、破線は直線回帰を示す。)

【図6】HPV 16 に対する競合物DNA 断片および標的プローブ、競合物プローブ、アンカープローブのヌクレオチド配列である。

【図7】HER-2/neu (標的)とその競合物、およびレポータープローブ、アンカープローブの塩基配列と、レポータープローブが標的と競合物にハイブリダイズするときの予想される溶解温度 $T_m$ を示す。

【図8】HPV 16 に対する競合物DNA 断片を作製するための戦略を図に示したものである。

【図9】内部定量標準とHPV 16 の人工鋳型を検出するために用いられたハイブリダイゼーションプローブを図に示したものである。

【図10】内部定量標準(▲)と人工HPV 16 鋳型(□)の検出効率を図に示したものである。データは少なくとも3回の別々に行ったデータの平均値で示されており、標準誤差をそれぞれについて記してある。

【図11】内部でコントロールされたハイブリダイゼーションプローブ反応からの蛍光データを証明する典型的な内部コントロール反応を示す。 $1 \times 10^9$  (1);  $5 \times 10^8$  (2);  $1 \times 10^8$  (3);  $5 \times 10^7$  (4);  $1 \times 10^7$  (5);  $5 \times 10^6$  (6);  $1 \times 10^6$  (7);  $5 \times 10^5$  (8);  $1 \times 10^5$  (9) の内部定量標準が図11a にプロットされている。それぞれのサンプルの中の $1 \times 10^6$  の濃度のHPV 16 は図11b に示されている。

【図12】内部定量標準(白三角)とHPV 16 (白四

角) に対する検出された蛍光とサイクル数を図に示したものである。それぞれの場合でHPV 16 の最初の鋳型濃度は  $1 \times 10^4$  である。内部定量標準の最初の鋳型濃度はそれぞれ  $1 \times 10^5$  (12a)、 $1 \times 10^4$  (図12b)、 $1 \times 10^3$  (図12c) である。

【図13】最初の競合物のコピー数の対数と交差閾値(デルタC.T.)を図に示したものである。内部定量標準反応と、異なる濃度のHPV 16 の人工鋳型のグラフである。HPV 16 の最初の鋳型濃度は  $1 \times 10^2$  (白丸)、 $1 \times 10^3$  (白三角)、 $1 \times 10^4$  (白四角)、 $1 \times 10^5$  (黒四角)、 $1 \times 10^6$  (黒三角) である。エラーバーは、4 回の独立の反応のデータポイントからの標準偏差から決定された。標的と競合物のそれぞれの比における95%の信頼区域をx軸に示した。

【図14】ハイブリダイゼーションプローブによって検出し、融解曲線解析ソフトウェアを用いて導いた、突然変異と野生型のHER-2/neu標的の融解ピーク面積と産物濃度の関係を示す。様々な濃度で人工オリゴヌクレオチド鋳型がプローブと混合され、融解ピーク面積はLightCyclerの融解曲線解析ソフトウェアを用いて決定された。

【図15】PCR増幅の後の、融解曲線解析による突然変異(M)と野生型(WT) HER-2/neu標的の定量を示す。突然変異と野生型の鋳型は、個々におよび様々な比で混合されたもの(入力比)が40サイクルのPCRによって増幅され、融解曲線がPCR産物より作成された。融解曲線は、突然変異と野生型PCR産物の比(出力比)を決定するためにTMBSアルゴリズムによって解析された。

【図16】センサープローブのみによって検出された

(図16aおよびb)、あるいはFRETプローブにより検出された(図16cおよびd)、野生型(WT)サンプル(—)、突然変異(Mut)サンプル(⋯)、野生型と突然変異対立遺伝子の50:50の比の混合物(Mix)(—)の融解解析のプロットである。図16aとcは融解データ(蛍光と温度)を示し、図16bとdは融解ピークデータ(負の1回微分-dF/dT)を示す。

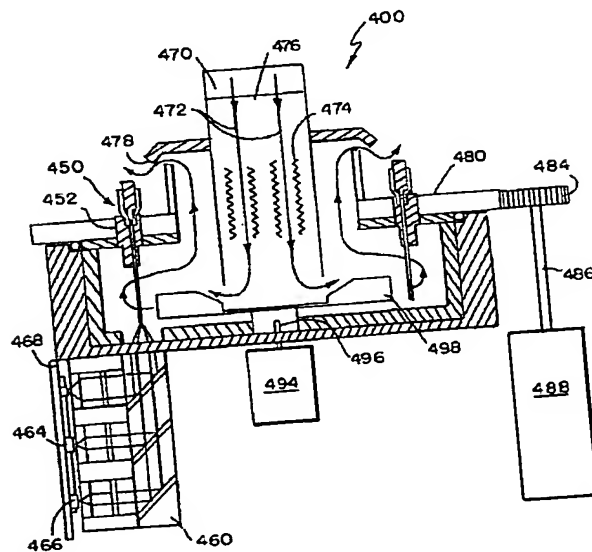
【図17】センサープローブのみによって検出された(図17aおよびb)、あるいはFRETプローブにより検出された(図17cとd)、野生型(WT)サンプル(—)、突然変異(Mut)サンプル(⋯)、野生型と突然変異対立遺伝子が95:5の比の混合物(Mix)(—)の融解解析のプロットである。図17aとcは融解データ(蛍光と温度)を示し、図17bとdは融解ピークデータ(負の1回微分-dF/dT)を示す。

【図18】熱力学モデルに基づくシグナル加工アルゴリズムのフローチャートである。

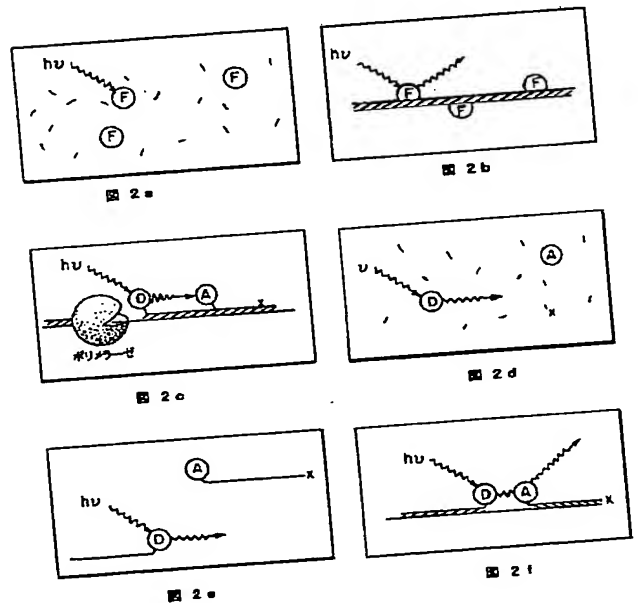
【図19】入力(サンプルに含まれる野生型対立遺伝子の正確な分画)と入力と出力(解析ソフトウェアによって予想された分画)の間の違いのプロットである。熱力学モデルを基にしたシグナル加工アルゴリズムからの結果(白丸)および融解ピーク面積ソフトウェア(黒丸)からの結果が示されている。

【図20】非直線の「アニーリング相」と、(融解相ではなく)融解移行相と、直線の「融解相」の3相からなる融解曲線を図で示したものである。融解曲線を近似するための基底関数近似アルゴリズムは、このモデルに基づく。

【図1】



【図2】



【図3】

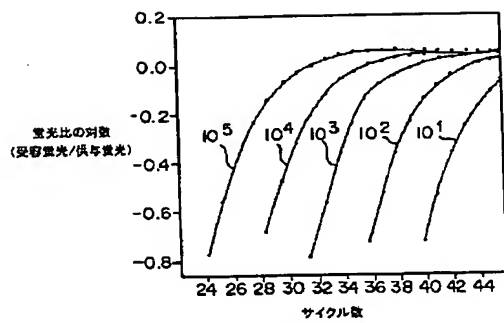


図 3 a

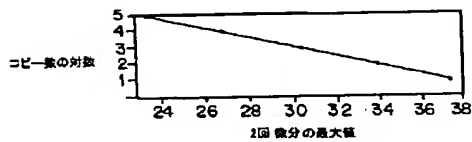


図 3 b

【図4】

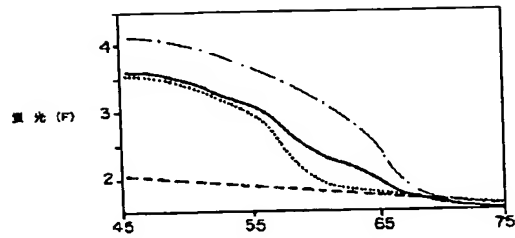


図 4 a

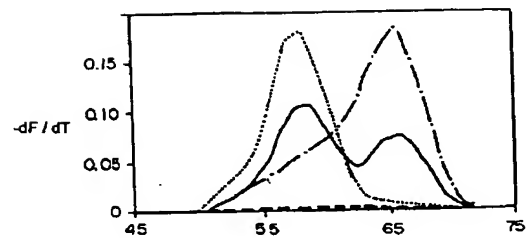


図 4 b

【図5】

図 5 a

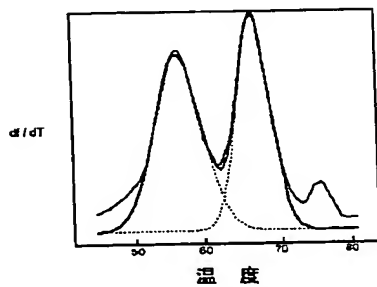


図 5 b

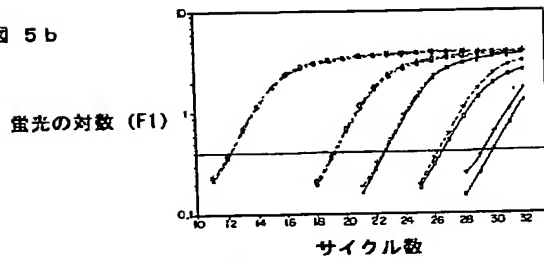
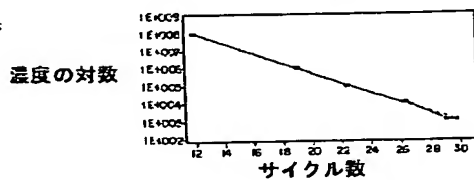


図 5 c



【図11】

パネルA

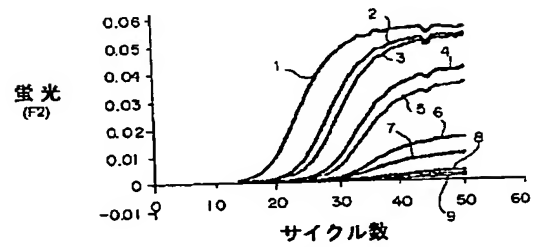


図 11 a

パネルB

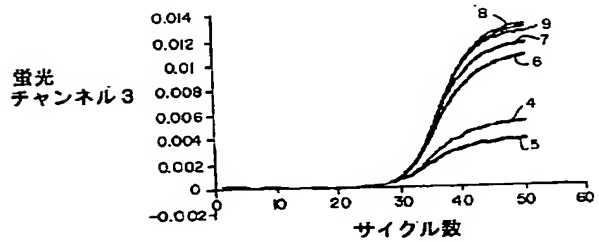
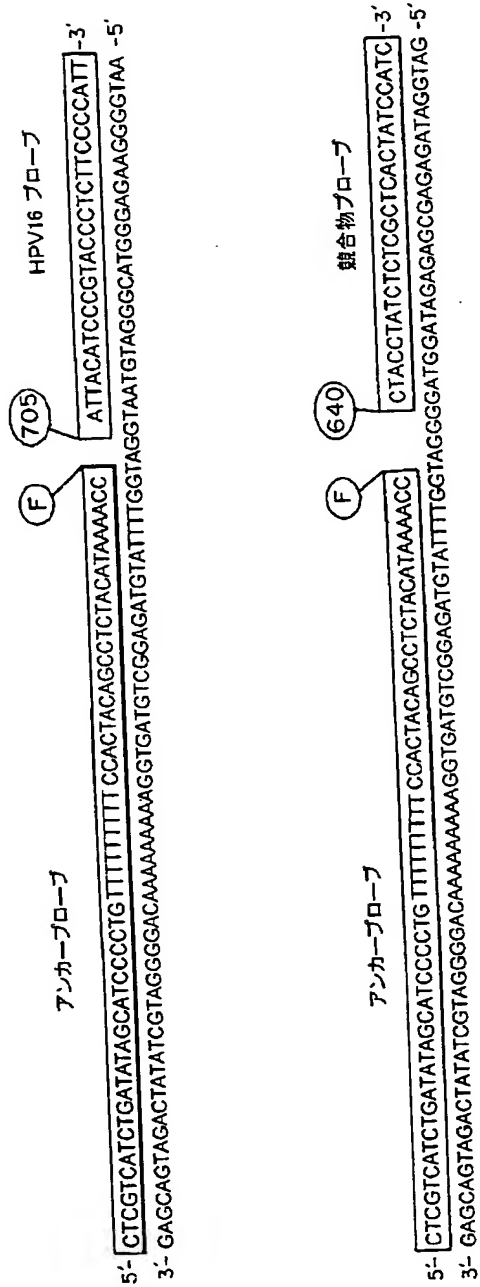


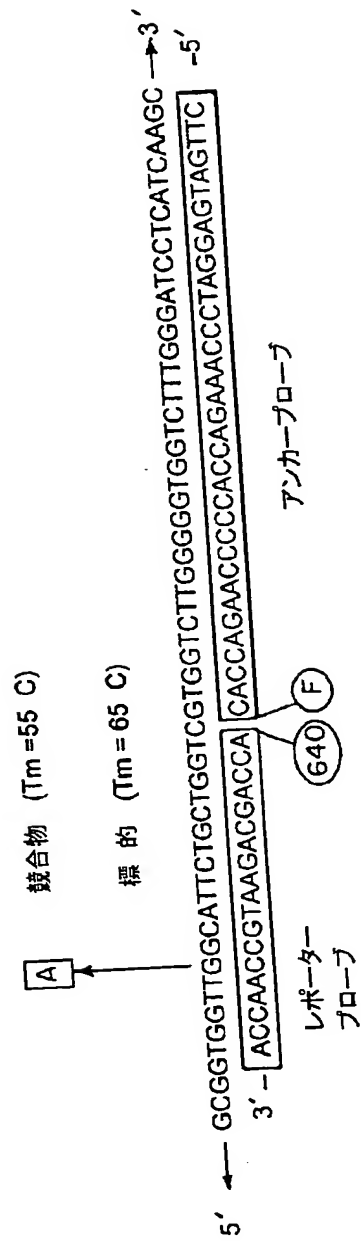
図 11 b



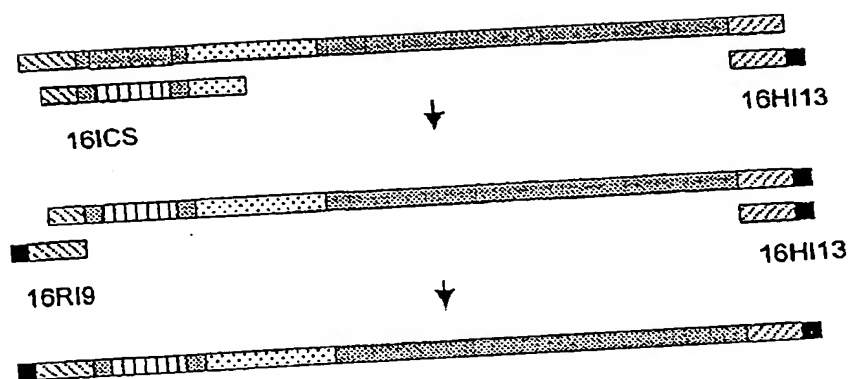
【図6】



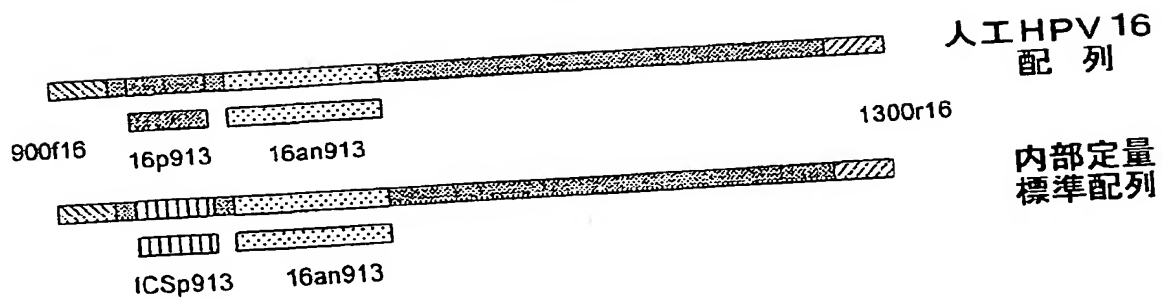
【図7】



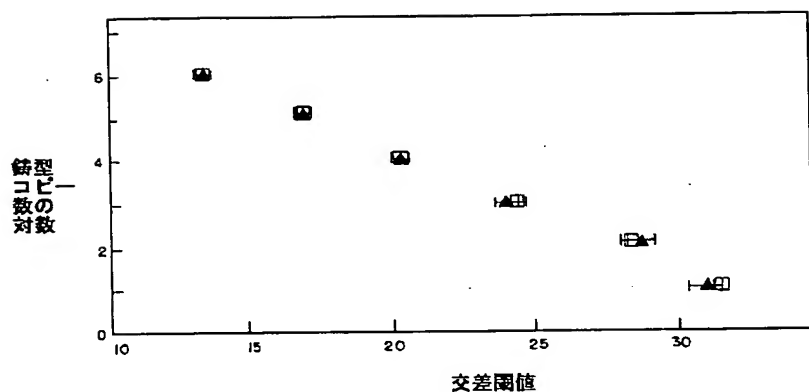
【図8】



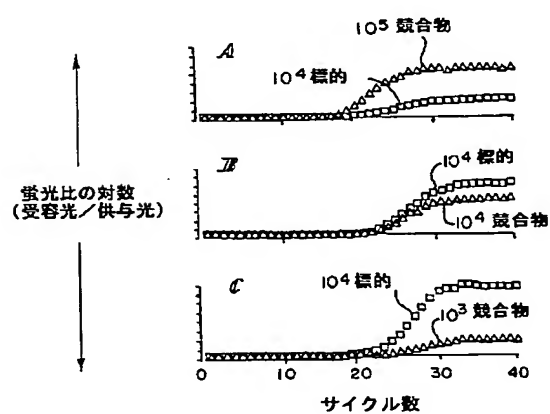
【図9】



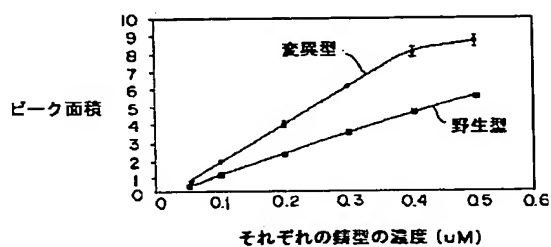
【図10】



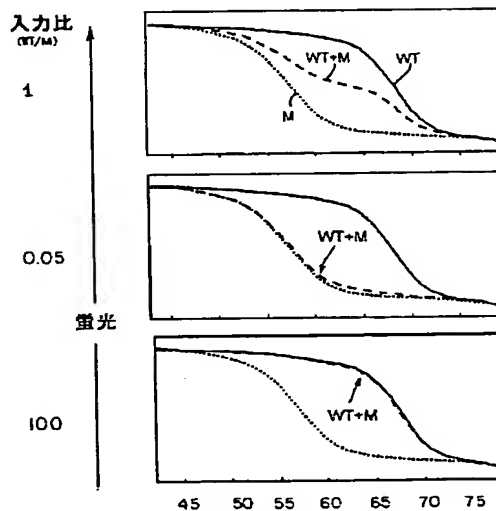
【図12】



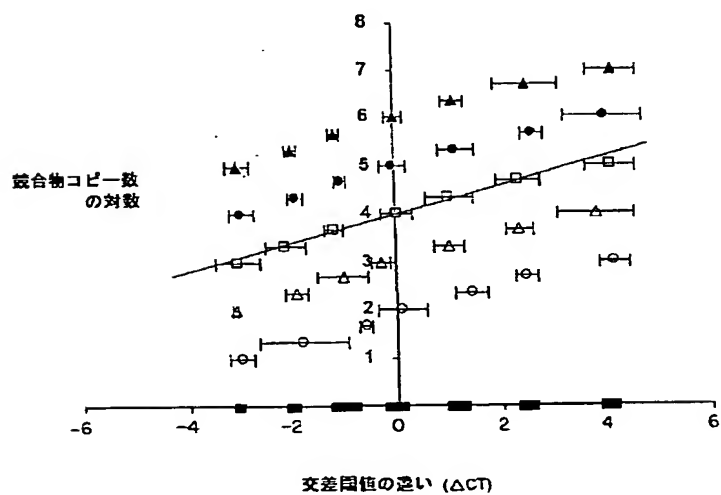
【図14】



【図15】



【図13】



【图16】

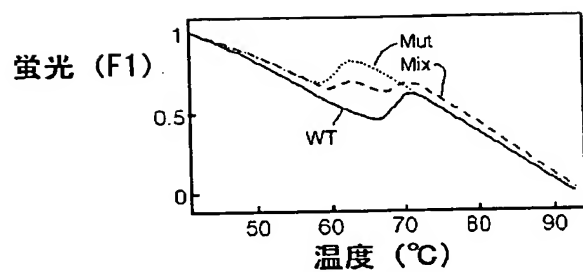


图 16 a

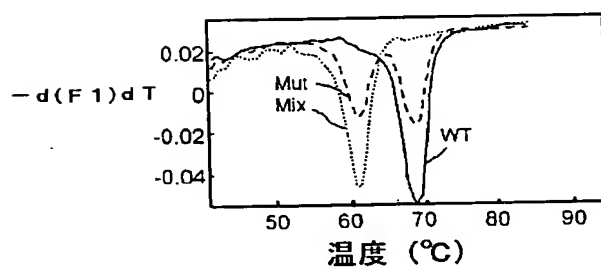


图 16 b

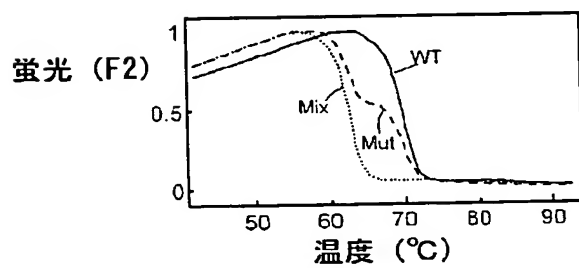


图 16 c

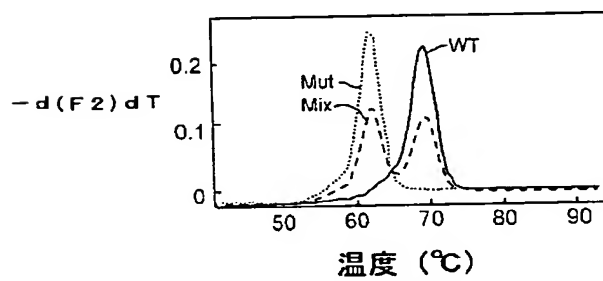


图 16 d

【図17】

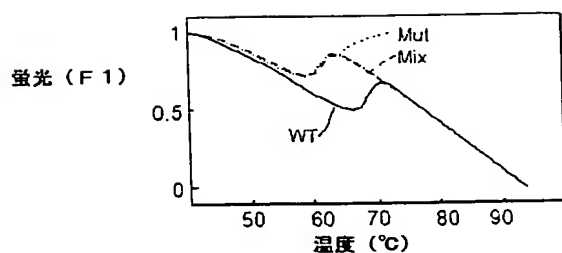


図 17 a

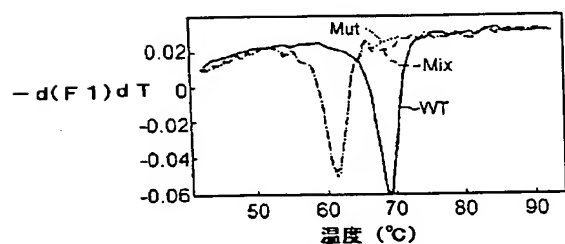


図 17 b

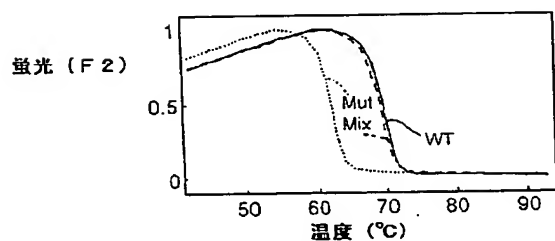


図 17 c

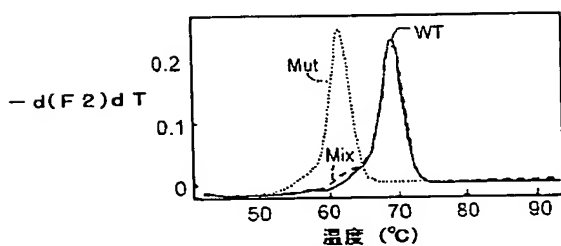
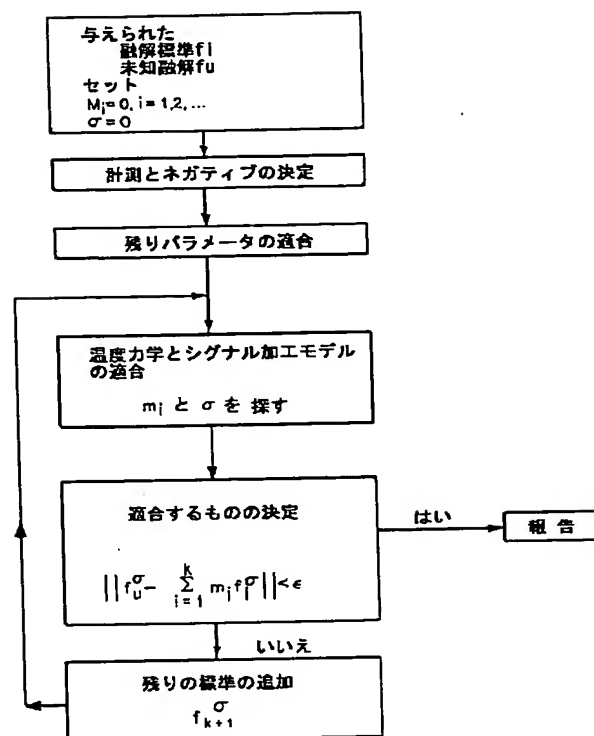
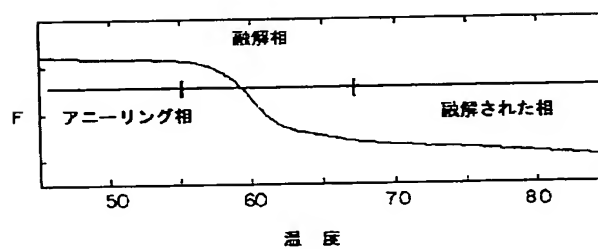


図 17 d

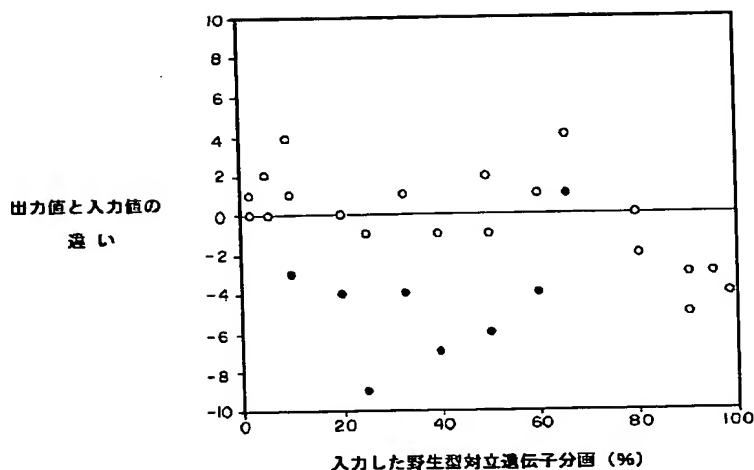
【図18】



【図20】



【図19】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>G 0 1 N 33/566  
33/58

識別記号

F I

G 0 1 N 33/58  
C 1 2 N 15/00

テーム (参考)

A  
Z N A A(72)発明者 エア, デヴィッド ジェイ.  
アメリカ合衆国・ユタ州 84102・ソルト  
レイク シティ・イースト 1130 サウ  
ス 600(72)発明者 ラスムッセン, ランディ ビー.  
アメリカ合衆国・ユタ州 84108・ソルト  
レイク シティ・レインビュー コート  
イースト 4347(72)発明者 カプリン, ブライアン イー.  
アメリカ合衆国・ユタ州 84124・ソルト  
レイク シティ・モーニングサイド ド  
ライヴ イースト 2918(72)発明者 スティーヴンソン, ウェイド アール.  
アメリカ合衆国・ユタ州 84084・ウェス  
ト ジョーダン・オーパル ヒル ドライ  
ヴ 7331(72)発明者 デシルヴァ, ディーピカ マリン  
アメリカ合衆国・ユタ州 84103・ウェス  
ト ジョーダン・ジラード プレイス ウ  
ェスト 137F ターム (参考) 2G045 AA35 BB51 DA13 FB02 FB12  
GC15 JA01  
4B024 AA11 CA03 HA14  
4B063 QA01 QA05 QA12 QA13 QA17  
QQ08 QQ42 QR32 QR56 QS25  
QS34 QS36 QX02



## 【 外国語明細書 】

## REAL-TIME GENE QUANTIFICATION WITH INTERNAL STANDARDS

## BACKGROUND

The polymerase chain reaction (PCR) is a technique of synthesizing large quantities of a preselected DNA segment. The technique is fundamental to molecular biology and is the first practical molecular technique for the clinical laboratory. PCR is achieved by separating the DNA into its two complementary strands, binding a primer to each single strand at the end of the given DNA segment where synthesis will start, and adding a DNA polymerase to synthesize the complementary strand on each single strand having a primer bound thereto. The process is repeated until a sufficient number of copies of the selected DNA segment have been synthesized.

During a typical PCR reaction, double stranded DNA is separated into its single strands by raising the temperature of the DNA containing sample to a denaturing temperature where the two DNA strands separate (i.e., the "melting temperature of the DNA") and then the sample is cooled to a lower temperature that allows the specific primers to attach (anneal), and replication to occur (extend). In illustrated embodiments, a thermostable polymerase is utilized in the polymerase chain reaction, such as Taq DNA Polymerase and derivatives thereof, including the Stoffel fragment of Taq DNA polymerase and KlenTaqI polymerase (a 5'-exonuclease deficient variant of Taq polymerase -- see U.S. Patent No. 5,436,149).

The years 1991 to 1998 have seen a 10 fold increase in the number of papers using quantitative PCR methods. One of the major reasons for this increased use of quantitative PCR derives from the fact that PCR has a sensitivity five orders of magnitude better than the best blotting procedures. This sensitivity makes PCR as a quantitative tool highly desirable. However, the use of a system undergoing exponential amplification is not ideally suited to quantification. Small differences between sample sizes can become huge difference in results when they are amplified through forty doublings.

*Kinetic PCR*

A typical PCR reaction profile can be thought of as having three segments: an early lag phase, an exponential growth phase, and a plateau. The lag

phase is mainly a reflection of the sensitivity of the instrument and the background signal of the probe system used to detect the PCR product. The exponential growth phase begins when sufficient product has accumulated to be detected by the instrument. During this "log" phase the amplification course is described by the equation  $T_n = T_0(E)^n$ , where  $T_n$  is the amount of target sequence at cycle  $n$ ,  $T_0$  is the initial amount of target, and  $E$  is the efficiency of amplification. Finally, in the plateau phase, the amplification efficiency drops off extremely rapidly. Product competes more and more effectively with primers for annealing and the amount of enzyme becomes limiting. The exponential equation no longer holds in the plateau phase.

Most of the quantitative information is found in the exponential cycles, but the exponential cycles typically comprise only 4 or 5 cycles out of 40. With traditional PCR methods, finding these informative cycles requires that the reaction be split into multiple reaction tubes that are assayed for PCR product after varying numbers of cycles. This requires either assaying many tubes, or a fairly good idea of the answer before the experiment is begun. Once the position of the exponential phase is determined, the experimental phase can be compared to known standards and the copy number can be calculated.

#### Competitive Quantitative PCR

Competitive quantitative PCR methods were developed to attempt to overcome difficulties associated with finding the exponential phase of the reaction and to obtain greater precision. A competitor sequence is constructed that is amplified using the same primers as are used to amplify the target sequence. Competitor and target are differentiated, usually by length or internal sequence, and the relative amount of competitor and target are measured after amplification. If the target and the competitor are amplified with equal efficiency, then their ratio at the end of the reaction will be the same as the ratio had been at the beginning. This holds true even into the plateau phase as long as both decline in efficiency at the same rate. Thus, finding the exponential region is no longer a problem. Providing standards in the same tubes with the unknown targets allows for additional control not possible with kinetic methods. For example, adding the competitor before mRNA purification would control for variations in sample preparation and reverse transcription.

The use of currently available competitive PCR techniques continues to suffer from several deficiencies. Firstly, the competitor sequence must be constructed to be as similar as possible to the target sequence with regard to the efficiency of amplification, yet the two sequences must be distinguishable from one another. If the competitor is too close in sequence to the target, heteroduplexes form during the PCR that skew the ratio of the product to the template.

In addition, competitor must be added to the unknown sample at a concentration approximating that of the target. If one product reaches plateau before the other rises above background, no quantitative information can be obtained from that sample. Usually an unknown sample is split and mixed with multiple concentrations of competitor.

Other concerns have been raised regarding competitive quantification methods. A common criticism is that despite all efforts, the target and the competitor together in a sample may be amplified at different efficiencies, even if target and competitor are amplified at the same efficiencies when amplified separately (the obvious control). When the target and competitor are combined in one vessel and the reagents are limiting, the efficiencies of the two amplification reactions may change at different rates. Length differences between target and competitor are of most concern here as the longer product may compete more effectively with the primers and may be more affected by reagent limitations. Both of these concerns could be addressed by making the target and competitor sufficiently alike, if it were not for the problem of forming heteroduplexes during the PCR reaction.

#### Real-Time Quantitative PCR

Developments in instrumentation have now made real-time monitoring of PCR reactions possible and thus have made the problem of finding the log phase of the reaction trivial.

Thermocycling may be carried out using standard techniques known to those skilled in the art, including the use of rapid cycling PCR. Rapid cycling techniques are made possible by the use of high surface area-to-volume sample containers such as capillary tubes. The use of high surface area-to-volume sample containers allows for a rapid temperature response and temperature homogeneity

throughout the biological sample. Improved temperature homogeneity also increases the precision of any analytical technique used to monitor PCR during amplification.

In accordance with an illustrated embodiment of the present invention, amplification of a nucleic acid sequence is conducted by thermal cycling the nucleic acid sequence in the presence of a thermostable DNA polymerase using the device and techniques described in U.S. Patent No. 5,455,175. In accordance with the present invention, PCR amplification of one or more targeted regions of a DNA sample is conducted while the reaction is monitored by fluorescence.

The first use of fluorescence monitoring at each cycle for quantitative PCR was developed by Higuchi et al., "Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences," Bio. Technology, 10:413-417, 1992, and used ethidium bromide as the fluorescent entity. Fluorescence was acquired once per cycle for a relative measure of product concentration. The cycle where observable fluorescence first appeared above the background fluorescence (the threshold) correlated with the starting copy number, thus allowing the construction of a standard curve. A probe-based fluorescence detection system dependent on the 5'-exonuclease activity of the polymerase soon followed. This improved the real-time kinetic method by adding sequence specific detection.

Alternatively, PCR amplification of one or more targeted regions of a DNA sample can be conducted in the presence of fluorescently labeled hybridization probes, wherein the probes are synthesized to hybridize to a specific locus present in a target amplified region of the DNA. In an illustrated embodiment, the hybridization probe system comprises two oligonucleotide probes that hybridize to adjacent regions of a DNA sequence wherein each oligonucleotide probe is labeled with a respective member of a fluorescent energy transfer pair. In this embodiment, the presence of the target nucleic acid sequence in a biological sample is detected by measuring fluorescent energy transfer between the two labeled oligonucleotides.

These instrumentation and fluorescent monitoring techniques have made kinetic PCR significantly easier than traditional competitive PCR. More particularly, real-time PCR has greatly improved the ease, accuracy, and precision of quantitative PCR by allowing observation of the PCR product concentration at every cycle. In illustrated embodiments of the present invention, PCR reactions are conducted using the LightCycler® (Roche Diagnostics), a real-time PCR instrument

that combines a rapid thermal cycler with a fluorimeter. Through the use of this device, the PCR product is detected with fluorescence, and no additional sample processing, membrane arrays, gels, capillaries, or analytical tools are necessary. Other PCR instrumentation, as known in the art, may be used in the practice of the present invention.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to a nucleic acid quantification kit and method for determining the initial concentration or mass fraction of a target nucleic acid present in a sample. More particularly, the present invention relates to the use of real-time competitive quantitative polymerase chain reaction (PCR) and fluorescently labeled oligonucleotide probes to monitor the PCR reaction in real time to determine the copy number of a target nucleic acid sequence in a sample. The method of determining the copy number of a target nucleic acid present in a biological sample comprises the steps of combining in a single reaction vessel at least a portion of the biological sample, a thermostable polymerase, a known amount of a competitor nucleic acid sequence, a pair of oligonucleotide PCR primers, one or more oligonucleotide probes, initiating the PCR reaction, and conducting real time monitoring of the reaction and/or melting curve analysis.

In an illustrated embodiment, the competitor nucleic acid sequence is prepared to have the identical sequence as the target nucleic acid sequence with the exception of a unique section located at an internal position on the competitive nucleic acid sequence. The unique section has the same overall nucleotide composition as the corresponding region of the target nucleic acid sequence but having a substantially different sequence from the corresponding region of the target nucleic acid sequence. The term substantially different is used herein to mean that a probe complementary to the unique region of the competitor will not cross-hybridize to the corresponding region of the target nucleic acid sequence above background levels under the reaction conditions used to conduct the PCR reaction. In one embodiment, the unique region has a randomized sequence relative to the corresponding region of the target nucleic acid sequence.

In another embodiment, the unique section of the competitor nucleic acid sequence differs from the target nucleic acid sequence by only one base pair,

similar to a point mutation. In still another embodiment, the unique section of the competitor nucleic acid sequence may be quite a bit different from the corresponding region of the target, varying in length and/or composition, but the competitor and target nucleic acid sequences are amplified with essentially the same efficiency. Such amplification efficiencies can be determined based on CG content and routine experimentation.

The anchor probe is configured to hybridize adjacent to the unique region of the competitor nucleic acid sequence and adjacent to the region of the target nucleic acid sequence corresponding to the unique region of the competitor nucleic acid sequence. The competitor probe is configured to hybridize to the unique region of the competitor nucleic acid sequence, and the target probe is configured to hybridize to the region of the target nucleic acid sequence corresponding to the unique region of the competitor nucleic acid sequence. Accordingly, when the anchor, target and competitor probes hybridize to their respective complementary target nucleic acid sequences and competitor nucleic acid sequences, the donor fluorophore and the first acceptor fluorophore as well as the donor fluorophore and the second acceptor fluorophore are placed in a resonance energy transfer relationship. Therefore, the measurement of fluorescence from the acceptor fluorophore can be used to determine the relative concentrations of the target nucleic acid sequence and the competitor nucleic acid sequence. In illustrated embodiments, the first fluorophore and the second fluorophore both accept energy transfer from the fluorophore donor, but the two acceptor fluorophores emit fluorescent energy at different wavelengths. Thus, the concentrations of the target nucleic acid sequence and the competitor nucleic acid sequence can be measured at the same time.

In still another embodiment, a single-labeled oligonucleotide is used and the desired information is obtained through melting curve analysis.

Another aspect of this invention is a method of quantifying the initial target nucleic acid sequence concentration based on the cycle shift between competitor and target. Provided that the efficiency of amplification is essentially equal for target and competitor,  $\log C_0 = \log E(\Delta n) + \log T_0$ , where  $C_0$  is the initial amount of competitor,  $E$  is the average efficiency,  $\Delta n$  is the cycle shift between target and competitor, and  $T_0$  is the initial amount of target. Because this equation has the form  $y=mx+b$ , a plot of the initial competitor concentration versus the cycle shift

between competitor and target will yield a line with the slope equal to the log of the efficiency and a y-intercept equal to the log of the initial target concentration. Since the competitor may be provided in a variety of known initial concentrations, the initial concentration of the target may be determined with relative ease.

One particularly useful application for DNA quantification may be in determining the genomic equivalents of particular viruses in any given clinical sample. Several viruses exhibit their pathological effects at various stages of their replication cycle, and the amount of virus in host cells can serve as an indicator of infection progression and prognosis.

In yet another aspect of this invention is method of determining mass fractions of first and second target nucleic acids present in a test sample, said method comprising the steps of contacting the target nucleic acids with a fluorescent nucleic acid indicator, the indicator being configured to provide a signal related to the quantity of indicator hybridized to the target nucleic acid, the indicator further configured to discriminate the target nucleic acids based on melting temperature, illuminating the test sample, monitoring fluorescent change to generate a melting curve, and using a thermodynamically based signal processing algorithm to determine the mass fraction of the target nucleic acids. The internal standard may consist of an artificial competitor or an endogenous allele that is different from the target nucleic acid sequence by one or more bases. If a known amount of the internal standard is added to the sample, then the initial copy number of the target nucleic acid sequence can be calculated from the mass fraction or ratio against the known amount of internal standard. Particularly useful applications for this type of quantification may be in determining allele frequencies in pooled population samples, monitoring differential allele expression in various cell and tissue types, monitoring gene amplification, or deletion, using imbalance of copy number against the copy number of a pseudogene, and assessing the ratio between different cell types in a mixed tissue sample, such as in margin dissected tissue samples from cancer patients.

Additional features of the present invention will become apparent to those skilled in the art upon consideration of the following detailed description of illustrated embodiments exemplifying the best mode of carrying out the invention as presently perceived.

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a diagrammatic representation of the mechanical and optical design of the LightCycler®;

Figs. 2a-f are diagrammatic representations of the various fluorescent-based methods of detecting amplification products. Figs. 2a-b represent detection of amplified products by double strand specific dyes. Figs. 2c-d represent the Taq Man strategy wherein synthesis of the amplified product results in donor emission. Figs. 2e-f represent the hybridization probe method wherein two separately labeled probes hybridize to adjacent regions of a nucleic acid sequence resulting in fluorescent resonance energy transfer;

Figs. 3a-b represent typical external standard curves using hybridization data. Fig. 3a is a plot of the log fluorescence ratio vs. cycle number. Fig. 3b is a plot of the log copy number vs. the second derivative maximum;

Figs. 4a-b represent a typical standard curve generated by plotting fluorescence vs. temperature (Fig. 4a) and the derivative of that curve plotted against temperature (Fig. 4b), with homozygous mutant (···), homozygous wild type (—•—), heterozygous mutant (—), and no DNA (— —);

Figs. 5a-c represent melting analysis of several nucleic acids. Fig. 5a shows melting peaks generated from a melting curve. The area under each curve is calculated using non-linear regression to fit the melting peak data to a Gaussian curve. Fig. 5b shows various amplification curves on a log fluorescence vs. cycle number plot. Fig. 5c shows the data from Fig. 5b converted into a  $\log C_0 = \log E (\Delta n) + \log T_0$  curve (solid line show crossing points from the data of Fig. 5b and dashed line is linear regression);

Fig. 6 represents the nucleotide sequences of the competitive DNA fragment for HPV 16 and the targeting, competitive and anchor probes;

Fig. 7 represents the nucleotide sequences of the HER-2/neu (target), its competitor, the reporter and anchor probes; the predicted melting temperatures  $T_m$  of the reporter probe hybridized to either the target or competitor are shown.

Fig. 8 is a diagrammatical representation of the strategy used to create the competitive DNA fragment for HPV 16;

Fig. 9 is a diagrammatical representation of the hybridization probes used to detect the internal quantification standards and the HPV 16 artificial template;



Fig. 10 is a graphic representation of the detection efficiency of the Internal Quantification Standard ( $\blacktriangle$ ) and Artificial HPV 16 template ( $\square$ ). The data are presented as the average of at least three separate data points, with standard deviations for each;

Figs. 11a-b illustrate a typical internal control reaction demonstrating fluorescent data from an internally controlled hybridization probe reaction. Internal quantification standards at concentrations of  $1 \times 10^9$  (1);  $5 \times 10^8$  (2);  $1 \times 10^8$  (3);  $5 \times 10^7$  (4);  $1 \times 10^7$  (5);  $5 \times 10^6$  (6);  $1 \times 10^6$  (7);  $5 \times 10^5$  (8);  $1 \times 10^5$  (9) are plotted in Fig. 11a. HPV 16 at  $1 \times 10^6$  in each of the samples is shown in Fig. 11b;

Figs. 12a-c are graphic representations of the detected fluorescence vs. cycle number for the Internal quantification standard (open triangles) and HPV 16 (closed squares). In each case HPV 16 is at an initial template concentration of  $1 \times 10^4$ . The internal quantification standard is at initial template concentrations of  $1 \times 10^5$  (Fig. 12a),  $1 \times 10^4$  (Fig. 12b), and  $1 \times 10^3$  (Fig. 12c);

Fig. 13 is a graphic representation of the log of initial competitor copy number versus difference in crossing threshold ( $\Delta C.T.$ ). A graph of internal quantification standard reaction with distinct concentrations of HPV 16 artificial template. HPV 16 initial template concentrations are:  $1 \times 10^2$  (open circles),  $1 \times 10^3$  (open triangles),  $1 \times 10^4$  (open squares),  $1 \times 10^5$  (closed circles),  $1 \times 10^6$  (closed triangles). Error bars are determined from the standard deviation from four independent reaction data points. The 95% confidence interval at each ratio of competitor to target is indicated on the x-axis.

Fig. 14 represents the correlation between melting peak area and product concentration for mutant and wild-type HER-2/neu targets detected by hybridization probes using melting curve analysis software. Artificial oligonucleotide templates were mixed with probes at various concentrations and melting peak-area was determined using LightCycler<sup>®</sup> melting curve analysis software.

Fig. 15 represents quantification of mutant (M) and wild-type (WT) HER-2/neu targets by melting curve analysis following PCR amplification. Mutant and wild-type templates, both individually and mixed at various ratios (input ratio), were amplified for 40 cycles of PCR and melting curves were generated from the PCR products. Melting curves were analyzed by the TMBSP algorithm to determine the ratios of mutant and wild-type PCR products (output ratio).

Figs. 16a-d are plots of melting analysis of a wild type (WT) sample (—), a mutant (Mut) sample (····), and a mixture (Mix) of wild and mutant alleles at 50:50 ratio (----), detected by the Sensor probe only (Figs. 16a, and b), or with the FRET pair probes (Figs. 16c, and d); Fig 16a and c show melting data (fluorescence vs temperature) and Figs. 16b and d show the melting peak data (negative first derivative  $-dF/dT$ ).

Figs. 17a-d are plots of melting analysis of a wild type (WT) sample (—), a mutant (Mut) sample (····), and a mixture (Mix) of wild and mutant alleles at 95:5 ratio (----), detected by the Sensor probe only (Figs. 17a, and b), or with the FRET pair probes (Figs. 17c, and d); Fig 17a and c show melting data (fluorescence vs temperature) and Figs. 17b and d show the melting peak data (negative first derivative  $-dF/dT$ ).

Fig. 18 is a flow chart of the Thermodynamic Modeling based Signal Processing algorithm.

Fig. 19 is a plot of Input (the actual fraction of the wild-type allele in samples) vs the difference between Input and Output (the fractions estimated by the analysis software). Results from the Thermodynamic Modeling based Signal Processing algorithm (open circle), and the melting peak area ratio software (closed circle) are shown.

Fig. 20 is a graphic representation of a model melting curve which has three phases: the non-linear "annealed phase," the melting transition (depicted as the "melting phase"), and the linear "melted phase." The basis function approximation algorithm is based on this model to approximate the melting curve.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention allows the quantification of analytes, including analytes that are too low in concentration to be quantitated using standard techniques. The method uses a competitive PCR reaction with real time monitoring during amplification or melting curve analysis, and the presence of an internal standard as a means of calculating the initial concentration of the target sequence. To date, all real-time PCR quantification applications have been limited to quantification relative to an external standard curve. While this technique is very useful, it lacks control for tube-to-tube differences in PCR efficiency. This limitation of quantification with external

standards has been addressed by competitive quantitative PCR methods. In these techniques a competitor, with the same primer sites as the target but differing in internal sequence, is spiked at a known concentration into an unknown sample. However, no real-time version of this method is available.

The present disclosure is directed to the use of real-time methods to differentiate target from competitor and thus allow for gene quantification by reference to an internal standard. The methods provide investigators with the advantages of a homogenous, real-time PCR system while giving the added control that internal standards provide.

In accordance with one embodiment, a method is described for conducting real-time competitive quantitative PCR using a competitor with a unique hybridization probe binding site. The competitor will be distinguished from the target by using differently colored hybridization probes for the target and the competitor.

In another embodiment, a method is described for conducting real-time competitive quantitative PCR using a competitor differing from the target by only a single base. The target and the competitor will be distinguished from one another by the differential melting of fluorescently labeled hybridization probes.

Fig. 1 provides a schematic representation of an embodiment 400 the LightCycler®, a thermal cycler that may be used in accordance with the described methods. As shown in Fig. 1, air is taken in through an aperture 470 and generally follows the flow path indicated by the lines 472. The temperature of the air, and thus the temperature of the sample container 450, is controlled with heating cartridge 474, which is positioned within a central duct 476, and fan 498, which is provided to move the air in the indicated path 472. The fan is driven via a shaft 496 and a motor 494. The fan 498 forces air into the aperture 470 and out via exhaust ports 478. In the illustrated embodiment, twenty-four sample containers 450 (two of which are represented in Fig. 1) are symmetrically arranged around the heating cartridge 474 and the central duct 476. The sample containers 450 are received by sleeves 452 in a circular carousel 480. The carousel 480 is positioned by a stepper motor 488 provided with a drive gear 484 that is connected to the motor 488 via a shaft 486. Fluorescence from each sample container is obtained by photo array 460, which includes an excitation radiation source 468 and photodetectors 464 and 466. More details of the LightCycler® may be found in U.S. Patent Application No. 08/869,275.

It is understood that this described embodiment is merely exemplary and that other thermal cyclers may be used within the scope of the invention.

By way of illustration, amplifying an analyte by PCR comprises the steps of placing a biological sample comprising the target nucleic acid sequence in a capillary vessel, raising the temperature of the biological sample from a first temperature ("annealing temperature") to a second temperature ("denaturation temperature") wherein the second temperature is higher than the first temperature, illustratively at least 15°C higher than the first temperature, holding the biological sample at the second temperature for a predetermined amount of time, lowering the temperature of the biological sample from the second temperature to at least as low as the first temperature and holding the biological sample at a temperature at least as low as the first temperature for a pre-determined length of time. The temperature of the biological sample is then raised back to the second temperature, and the biological sample is thermocycled a predetermined number of times.

In one embodiment, the method of amplifying a DNA sequence comprises a two temperature profile wherein the samples are cycled through a denaturation temperature and an annealing temperature for a predetermined number of repetitions. Other PCR profiles may be used within the scope of this invention. For example, the PCR reaction can also be conducted using a three temperature profile wherein the samples are cycled through a denaturation temperature, an annealing temperature, and an elongation temperature for a predetermined number of repetitions.

In illustrated embodiments, the PCR reaction is conducted in the presence of fluorescent entity to allow real-time monitoring of the reaction. Several detection formats based on target dependent fluorescent signaling have been disclosed which enable continuous monitoring of the generation of amplification products. See, for example, Wittwer et al., "Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification," BioTechniques, Vol. 22, No. 1, 130-138, 1997). These detection formats include but are not limited to:

1. Use of fluorescent double-stranded DNA recognizing compounds (see Figs. 2a-b)

Since the amount of double stranded amplification product usually exceeds the amount of nucleic acid originally present in the sample to be analyzed, double-stranded DNA specific dyes may be used, which upon excitation with an appropriate wavelength show enhanced fluorescence only if they are bound to double-stranded DNA (Fig. 2b). Preferably, only dyes such as SYBR™ Green I, which do not affect the efficiency of the PCR reaction are used.

2. Taq Man principle (see Figs. 2c-d)

In order to detect the amplification product, a single-stranded hybridization probe is used. The hybridization probe is labeled with a fluorescent entity, the fluorescence emission of which is quenched by a second label on the same probe that acts as a quenching compound. During the annealing step of the PCR reaction, the probe hybridizes to its target sequence (Fig. 2c), and, subsequently, during the extension of the primer, a DNA polymerase having a 5'-3'-exonuclease activity digests the hybridization probe into smaller pieces, separating the fluorescent entity from the quencher compound (Fig. 2d). After appropriate excitation, fluorescence emission can be monitored as an indicator of accumulating amplification product.

3. Molecular beacons

Similar to the Taq Man Probes, a molecular beacon oligonucleotide is labeled with a fluorescent compound and a quencher compound, which due to the secondary structure of the molecule are in close vicinity to each other. Upon binding to the target DNA, the intramolecular hydrogen bonding is broken, and the fluorescent compound located at one end of the probe is separated from the quencher compound, which is located at the opposite end of the probe. See, for example, U.S. Patent No. 5,118,801.

4. Increased FRET upon hybridization (see Figs. 2e-f)

For this detection format, two oligonucleotide hybridization probes, each labeled with a fluorescent moiety, are used which are capable of hybridizing to

adjacent but non-overlapping regions of one strand of the amplification product. Preferably, one oligonucleotide is labeled at the 5' end and the second oligonucleotide is labeled at the 3' end. When hybridized to the target DNA, the two fluorescent labels are brought into close contact, such that fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the two fluorescent moieties can take place (Fig. 2f). As a consequence, the hybridization can be monitored through excitation of the donor moiety and subsequent measurement of fluorescence emission of the second acceptor moiety.

In a similar embodiment, only one fluorescently labeled probe is used, which together with one appropriately labeled primer may also serve as a specific FRET pair. See Bernard et al., "Integrated Amplification and Detection of the C677T Point Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene by Fluorescence Resonance Energy Transfer and Probe Melting Curves," *Anal. Biochem.* 255, p. 101-107 (1998).

Usually, the hybridization probes as disclosed have sequences completely identical with or exactly complementary to the sequence of the analyte. However, it is also within the scope of the invention for probes to contain one or several mismatches, as long as the probes are capable of hybridizing to the analyte under appropriate hybridization conditions. In any case, it has been proven to be particularly advantageous if the sequence identity or complementarity is 100% over a range of at least 10 contiguous residues. It has also been proven to be advantageous if the length of the probe does not exceed 100 nucleotides, preferably not more than 40 nucleotides.

Fluorescence resonance energy transfer occurs between two fluorophores when they are in physical proximity to one another and the emission spectrum of one fluorophore overlaps the excitation spectrum of the other. The rate of resonance energy transfer is

$$(8.785 \times 10^{-5}) (t^{-1}) (k^2) (n^4) (q_D) (R^{-6}) (J_{DA}), \text{ where:}$$

$t$  = excited state lifetime of the donor in the absence of the acceptor;

$k^2$  = an orientation factor between the donor and acceptor;

$n$  = refractive index of the visible light in the intervening medium;

$q_D$  = quantum efficiency of the donor in the absence of the acceptor;

$R$  = distance between the donor and acceptor measured in Angstroms;

and

$J_{DA}$  = the integral of  $(F_D)(e_A)(W^4)$  with respect to  $W$  at all overlapping wavelengths with:

$F_D$  = peak normalized fluorescence spectrum of the donor;

$e_A$  = molar absorption coefficient of the acceptor ( $M^{-1}cm^{-1}$ ); and

$W^4$  = wavelength (nm).

For any given donor and acceptor, a distance where 50% resonance energy transfer occurs can be calculated and is abbreviated  $R_0$ . Because the rate of resonance energy transfer depends on the 6th power of the distance between donor and acceptor, resonance energy transfer changes rapidly as  $R$  varies from  $R_0$ . At  $2 R_0$ , very little resonance energy transfer occurs, and at  $0.5 R_0$ , the efficiency of transfer is nearly complete, unless other forms of de-excitation predominate.

The fluorescently labeled oligonucleotides are designed to hybridize to the same strand of a DNA sequence such that the donor and acceptor fluorophores are separated by a distance ranging from about 0 to about 25 nucleotides, more preferably about 0-5 nucleotides, and most preferably about 0-2 nucleotides. A particularly preferred spacing between the donor and acceptor fluorophores is about 1 nucleotide.

When one of the labeled oligonucleotides also functions as a PCR primer ("probe-primer"), then the two fluorescent entities are on opposite strands of a DNA sequence. In this embodiment, the donor and acceptor fluorophores are preferably within about 0-15 nucleotides and more preferably within about 4-6 nucleotides.

Unless both of the fluorescently labeled oligonucleotides are hybridized to their complementary sequence on the targeted DNA, the distance between the donor fluorophore and the acceptor fluorophore generally is too great for resonance energy transfer to occur. Thus, in the absence of hybridization, the acceptor fluorophore and the donor fluorophore are not in resonance energy transfer relationship and excitation of the donor fluorophore will not produce a detectable increased fluorescence by the acceptor fluorophore.

Acceptable fluorophore pairs for use as fluorescent resonance energy transfer pairs are well known to those skilled in the art and include, but are not limited

to, fluorescein/rhodamine, phycoerythrin/Cy7, fluorescein/Cy5, fluorescein/Cy5.5, fluorescein/LCRed 640 or fluorescein/LCRed 705. LCRed 640 and LCRed 705 have been previously described in European Publication EP 0 567 622.

The thermal stability of a DNA duplex relies on duplex length, GC content, and Watson-Crick base pairing. Changes from Watson-Crick base pairing destabilize a duplex by varying degrees depending on the length of the mismatched duplex, the particular mismatch, the position of the mismatch, and neighboring base pairs. Accordingly, the percent identity of the hybridization probes to their target complementary sequence directly affects the temperature at which the hybridization probe will separate (melt) from the complementary strand. The greater the difference between the probe and the target complementary sequence, the lower the temperature needed to separate the hybridizing strands.

#### 5. Single-Labeled Oligonucleotides

Single-labeled oligonucleotides are oligonucleotides having a singular fluorescent label. The single-labeled oligonucleotides may be used independently of any other fluorescent entities, and fluorescent change occurs due to the sequence of the bases located on the complementary strand. See U.S. Patent Application No. 09/927,842, filed August 10, 2001. Depending on various factors, such as the fluorescent entity used and the sequence of the complementary strand, hybridization may result in either a decrease or increase in fluorescence.

#### Probe Systems for the LightCycler®

A sequence specific probe system for the LightCycler® has been developed for use in the present invention wherein two fluorophores of a FRET pair are brought close together by hybridization during PCR so that resonance energy transfer occurs (see Figs. 2e-f). Two adjacent hybridization probes are designed to hybridize between the PCR primers, one labeled at the 3' end with a donor fluorophore, the other labeled at the 5' end with an acceptor fluorophores. As product accumulates during PCR, the probes hybridize next to each other during the annealing segment of each cycle. Fluorescence energy transfer to the acceptor dye increases with hybridization and is plotted as a ratio of acceptor to donor fluorescence. For quantification, the fluorescence preferably is monitored once each cycle near the end



of a two-temperature annealing extension segment. A version of the LightCycler<sup>®</sup> has been optimized for use with one donor dye, fluorescein, and two different acceptor dyes, LightCycler Red 640 (LCRed 640) and LightCycler Red 705 (LCRed 705). While FRET oligonucleotide pairs are commonly used with the LightCycler<sup>®</sup> and are used various examples herein, it is understood that other sequence specific probes may be used within the scope of this invention.

#### Real-Time Kinetic PCR on the LightCycler<sup>®</sup>

The LightCycler<sup>®</sup> can be used with either double stranded DNA binding dyes such as SYBR<sup>™</sup> Green I or hybridization probes to monitor the PCR reaction. Fig. 3a and 3b show typical external standard curves using hybridization probes. The donor probe was labeled with fluorescein and the acceptor with LCRed 640. The data are plotted as the ratio of acceptor to donor fluorescence. The initial concentration of standard ranged from  $10^5$  to  $10^1$  copies of target per 10  $\mu$ l reaction.

#### Mutation Detection using the LightCycler<sup>®</sup>

Monitoring once each cycle provides useful information for quantification. Additional information is available if fluorescence is monitored continuously during temperature transitions. The hybridization state of the probes can be determined by measuring the change in fluorescence as the temperature is varied. Hybridization probe melting occurs at a characteristic temperature that can be exploited for product identification and mutation detection.

#### Quantification by Kinetic PCR

The temperature dependence of the fluorescence from hybridization of the probes may be demonstrated with fluorescence vs. temperature plots (Fig. 4a). The illustrated plots were generated by monitoring a single sample every 0.1°C during a slow (0.2°C/second) temperature ramp from 45°C to 75°C. The product is denatured and then rapidly cooled (10°C/second) to 45°C. At low temperature the probes hybridize to single-stranded product and the fluorescence ratio (for example LCRed 640/ fluorescein) increases. During heating, the probes dissociate in the 55 to 65°C range, returning the fluorescence ratio to background levels. The derivative of this

curve is calculated with respect to temperature and plotted against temperature (Fig. 4b). This produces a melting peak centered around the  $T_m$  of the probe. Discrimination based on hybridization temperatures is a powerful tool for mutation detection.

#### A Method Combining Mutation Detection with Quantification

The use of an internal standard in competitive quantitative PCR assays involves careful selection of the competitor used as the internal standard. The competitor and the target in competitive quantitative PCR assays must fulfill contradictory criteria. The two nucleic acid sequences must amplify with the same efficiency, generally requiring them to be as similar as possible. But they must also be differentiable and not prone to heteroduplex formation, requiring them to be dissimilar.

The ultimate in similarity between target and template is a single base pair change. It is extremely unlikely that a single base change would have a significant effect on efficiency of amplification. In accordance with one embodiment of this invention, the LightCycler<sup>®</sup> is used to differentiate between a target and a competitor differing by only a single base pair, as in a single base pair mutation. Under proper conditions, hybridization probes detect only one of the DNA strands, so heteroduplex formation during amplification does not affect the results.

In the course of the development of the LightCycler<sup>®</sup>, software has been developed for analysis of real-time fluorescence data. Fig. 5a is a representative melting curve. The software calculates the area under each curve using non-linear regression to fit the melting peak data to a Gaussian curve. This module serves as the basis of the software for quantification using the  $T_m$  method. The relative peak areas of target and competitor are used to calculate the relative amounts of the two products.

Fig. 5b shows various amplification curves on a log fluorescence vs. cycle number plot. For each curve, the point in the amplification curve where the second derivative is at a maximum is identified, that is, the point of maximal increase in the rate of increase. This fractional cycle number is used to describe the position of the amplification curve. Unlike traditional "threshold" methods that define the curve position relative to background noise, this approach allows the automatic

determination of the positions of the amplification curves based on the shape of the curve. See U.S. Patent No. 6,387,621. This module serves as the basis of the software for the multi-color method. The relative amounts of target and competitor are determined by looking at the fractional cycle difference in the positions of the two amplification curves, as shown in Fig. 5c.

#### A Method Combining Kinetic PCR with Internal Standards

In an alternative embodiment, the competitor/internal standard is distinguished from the target nucleic acid by differential probe hybridization during the PCR reaction. Thus, the reaction is monitored and hybridization is detected as it occurs: a "real-time probe capture." This makes it possible to determine the amount of the target and competitor kinetically, not merely from an endpoint measurement.

In an illustrated embodiment, a kinetic internal standard quantification method is used where the target and competitor differ only at the probe binding site. The competitor probe and the target probes are labeled with differently colored fluorophores (LCRed 640 and LCRed 705). Both of these probes are paired with a longer fluorescein "anchor probe." Both target and competitor are monitored simultaneously, once-each-cycle. Illustratively, the optical design of the system used in this embodiment is three color and based on paraxial epifluorescent illumination of the capillary tip. Total internal reflection along the capillary axis increases signal strength by about 10-fold. The excitation source is a "super bright" blue light emitting diode. Fluorescence signals are acquired from photodiodes after bandpass filtering in the three channels at 520 nm, 640 nm and 705 nm.

Like the  $T_m$  method, heteroduplex formation is not a concern, as only one of the DNA strands is detected by the hybridization probes. Work with external standards has shown that the position of amplification curves is more reproducible than the final fluorescence levels. Accordingly, since data are collected every cycle in this kinetic method, the more reliable data from earlier cycles are used. Advantageously, the present method does not depend on a single measurement to define the product ratios. Instead, the relative positions of the entire amplification curves are used to determine the ratio of the two products.

If reactions containing the same target and competitor concentrations give amplification curves that are in the same position, then the shift in the curve

position between target and competitor can be used to calculate the ratio of target and competitor. This method provides precise estimates of target and competitor amounts.

#### Delta C.T. Equation Determination

The above approach has not previously been used with quantification with internal standards. Thus, a convenient, preferably linear mathematical relationship between the target and the competitor's curve positions and their relative concentrations is needed. If target and competitor have the same efficiency, then at the second derivative maximum for the target:

$$T_{nt} = T_o (E)^{nt}$$

where  $T_{nt}$  is the amount of target at the second derivative maximum,  $T_o$  is the initial amount of target,  $E$  is the average efficiency, of the reaction, and  $nt$  is the fractional cycle number of the second derivative maximum. Similarly at the second derivative maximum for the competitor:

$$C_{nc} = C_o (E)^{nc}$$

where  $C_{nc}$  is the amount of competitor at the second derivative maximum,  $C_o$  is the initial amount of competitor,  $E$  is the average efficiency of the reaction, and  $nc$  is the fractional cycle number of the second derivative maximum.

The second derivative method is sensitive to the shape of the amplification curve, not the absolute fluorescence level. The position of the amplification curve should not be significantly affected by differences in signaling efficiency between LCRed 640 and LCRed740. The point where the second derivative is at a maximum does not reflect a certain signal level but rather the accumulation of a certain amount of product. At their respective second derivative maxima, the concentrations of target and competitor should be equal. Therefore:

$$C_{nt} = T_{nc}$$

And so it follows that:

$$C_o(E)^{nc} = T_o(E)^m$$

Rearranging:

$$C_o/T_o = (E)^{n1}/(E)^{nc}$$

Taking the log of both sides:

$$\log(C_o/T_o) = \log[(E)^{n1}/(E)^{nc}]$$

$$\log C_o - \log T_o = n1 \log E - nc \log E$$

$$\log C_o - \log T_o = \log E (n1 - nc)$$

$n1 - nc$  is the cycle shift between target and competitor which we can call  $\Delta n$ ,  
substituting:

$$\log C_o - \log T_o = \log E (\Delta n)$$

And rearranging:

$$\log C_o = \log E (\Delta n) + \log T_o$$

This delta C.T. equation has the form  $y = mx + b$ , so a plot of the initial competitor concentration versus the cycle shift between competitor and target will give a line with the slope equal to the efficiency and a y-intercept equal to the log of the initial target concentration.

#### EXAMPLE 1

The following experiment is conducted to confirm that equal concentrations of initial target and competitor template give equal second derivative maxima.

Equal concentrations of purified target and competitor PCR are mixed together at concentrations ranging from  $10$  to  $10^6$  copies per reaction in 10 fold steps and amplified for 35 cycles. The positions of the second derivative maximum for all of the target and competitor pairs are compared and it is expected that the second derivative maxima are the same for equal concentrations. This experiment is repeated five times and statistical tests are conducted to determine if a zero difference in crossing point is within the 95% confidence interval of  $\Delta n$ . If the difference is not zero, but the difference is consistent, a " $\Delta\Delta n$ " can be used, that is, the difference in curve position less any systematic difference between the two channels.

## EXAMPLE 2

The following experiment is conducted to confirm that the dynamic range of the assay is at least an order of magnitude on either side of the target concentration.

If either the target or the competitor is present in great excess, the more concentrated product will reach a plateau before the less concentrated product rises above the detection limit of the instrument. The LightCycler<sup>®</sup> has a detection range of approximately two orders of magnitude. This detection range defines the upper limit of the dynamic range. A minimum dynamic range of at least a one order of magnitude difference is desirable.

The maximum difference in target/competitor ratio that still allows both products to be detected is tested. Target at  $10^4$  copies per reaction is mixed with competitor ranging from  $10^2$  to  $10^6$  copies per reaction in one third log steps. A dynamic range of between one and two orders of magnitude is expected. The target copy number is calculated using the kinetic method and is compared to the actual target concentration. This experiment is repeated five times and the precision of the calculated target number is determined.

Once the maximum target to competitor difference has been established with  $10^4$  copies of target, the maximum difference in target/competitor ratio across a range of target concentrations is determined. Target from  $10^1$  to  $10^6$  copies per reaction is mixed with competitor differing by 2-fold, 5-fold, 10-fold, 20-fold up to the maximum difference in target/competitor ratio defined by the experiments above. The target copy number is calculated using the kinetic method

and is compared to the actual target concentration. This experiment is repeated five times and the precision of the calculated target number is determined.

#### EXAMPLE 3

The following experiment is conducted to determine the effect of target copy number on the accuracy and precision of the assay.

Results of the PCR experiments are analyzed for precision and accuracy. For each starting copy number of target from  $10^1$  to  $10^6$ , a 95% confidence interval is calculated. The inter-assay and intra-assay precision is also calculated by measuring the coefficient of variation (%CV) within and across experiments for each starting copy number of target from  $10^1$  to  $10^6$ . At  $10^1$  or  $10^2$  copies, it is expected that the %CVs will be around 100%. At the higher copy numbers the %CVs are expected to be around 25%. A 25% CV would allow easy discrimination of two-fold differences.

#### Software

The curve positions are calculated using the second derivative maximum method. This method, which depends on curve shape and not absolute signal, is believed to be more resistant to differences in signaling efficiency between the channels. The cycle shift is plotted against the initial competitor concentration and a line is fit to the data. If the single point method gives reasonable answers (%CV < 50), then the software supports this calculation as well.

#### EXAMPLE 4

A method for real-time competitive quantitative PCR in the LightCycler® using a competitor which differs from the target by only a single base is described in the following experiment. The target and the competitor are distinguished by the differential melting of fluorescently labeled hybridization probes.

#### Experimental Design

The target for quantification in this example is the human HER-2/neu gene. The HER-2/neu gene is amplified in 25% of breast tumors and the degree of amplification (usually 2-50 fold) correlates with survival time. Fig. 7 shows a design

of probes for HER-2/neu. With this design, the competitor has a CA mismatch with the hybridization probe. A CA mismatch in the center of a probe results in a  $T_m$  shift of 5-10°C, sufficient to allow for separation of the matched and mismatched melting peaks. The primers that flank these probes (not shown) were designed using the Primer Designer™ software (Scientific and Educational Software).

#### Construction of the Competitor

Wild type HER-2/neu PCR product generated from human genomic DNA is used as the target. The competitor is generated by amplification of HER-2/neu from genomic DNA with a mutagenic PCR primer containing a G to A change, as shown in Fig. 7. The PCR products are gel purified, diluted, and then reamplified with the amplification primers. These products are gel purified and used as target and competitor. The introduction of the mutation is confirmed by sequencing.

Target and competitor concentrations are determined by Molecular Probes PicoGreen dsDNA quantification assay or by the limiting dilution method as discussed above.

#### Probe Synthesis and Purification

The probes are shown in Fig. 7. The anchor probe is 3' fluorescein labeled. The acceptor probe is labeled on the 5' end with LightCycler Red 640 and is blocked on the 3' end by a phosphate. Probes are synthesized and purified as discussed above.

#### Quantification with Internal Standards

First, a determination is made that the signals from target and competitor (that is, the melting peak areas) are proportional to the amount of target present. This is first done with purified PCR products. Wild type and competitor HER-2/neu are mixed in equal concentrations from  $10^{10}$  to  $10^{12}$  copies per tube. The melting peaks are obtained by rapidly dropping the temperature below the annealing temperature of the probes and then slowly heating (0.2 °C/second) to a temperature 15°C above the melting temperature of the probes. Fluorescence is acquired every 0.1°C during the ramp. The ratio of the areas under the best-fit Gaussians is



compared to the known initial target/competitor ratio of 1.0. Statistical tests produce a ratio of 1.0 that falls within the 95% confidence intervals.

Preferably, not only do equal amounts of purified PCR product produce equal signal; the proportions should stay constant throughout amplification. Accordingly, purified target and competitor PCR products are mixed together at equal concentrations from  $10^1$  to  $10^6$  copies per reaction in 10-fold steps, amplified for 35 cycles, and then studied by performing a melting curve analysis. This experiment is repeated five times. The ratio of the areas under the best fit Gaussians is compared to the known initial target/competitor ratio of 1.0. Statistical tests are conducted to determine whether a ratio of 1.0 falls within the 95% confidence intervals, and results show that the amplification efficiencies of the target and competitor molecules are indistinguishable.

The final amount of PCR product produced, and thus available for melting curve analysis, is dependent upon many variables, but will not exceed the amount of primer used. Hybridization probe reactions typically use between  $0.1 \mu\text{M}$  and  $0.5 \mu\text{M}$  primers, so the highest concentration of product that can theoretically be produced by PCR would be between  $0.1$  and  $0.5 \mu\text{M}$ . Preliminary experiments indicated that accurate measurement of product amounts by melting-peak areas needed probe concentrations in excess of the total amount of PCR product produced after amplification. This posed problems for the standard LightCycler® optics, since fluorescein probe concentrations higher than  $\sim 0.2 \mu\text{M}$  will exceed the detection level in the F1 channel. To overcome this problem the F1 optics of a LightCycler® was modified to block  $\sim 90\%$  of the fluorescent signal transmitted to the F1 detector. In this manner higher concentrations of probe could be used so that the probe concentrations are always in excess of product. Reconstructed melting experiments using artificial templates of known concentration were designed to measure peak areas with this modified instrument using excess probe. Fig. 14 shows that there is a linear correlation between melting peak areas and product concentrations between  $0.1$  and  $0.4 \mu\text{M}$  using  $1.0 \mu\text{M}$  of each probe. These results indicate that end-point PCR product (using primer concentration of  $0.5 \mu\text{M}$  or less) will consistently produce melting peak areas within this linear range and yield quantitative information.

#### Dynamic range of quantification by melting peak analysis

A linear relationship between melting peak area and amount of PCR product could be established for a ten-fold difference in the relative amounts of the two molecules in reconstructed melting experiments using the conventional LightCycler® melting analysis software. To broaden the dynamic range of this technique, a novel method of melting curve analysis was developed based on a Thermodynamic Modeling based Signal Processing (TMBSP, see Example 6) of the melting curve data: the components of a heterogeneous melting curve are quantitatively described in terms of their volume fractions with respect to homogeneous melting curves for each component.

Figure 15 shows the results of mixing wild-type (WT) and mutant (M) template molecules at input ratios ranging from 20:1 to 1:100, followed by 45 cycles of PCR amplification and melting curve analysis to identify the relative amounts of wild-type and mutant product after amplification (output ratios). These results show that TMBSP analysis of melting curves can distinguish 1 molecule in 100 following 45 cycles of PCR amplification.

#### Precision of the assay

Table 1 summarizes the accuracy of quantification by melting-peak analysis. Ratios of as much as 1 in 50 are discernable with reasonable accuracy and at a 100-fold difference the minor species can still be routinely detected, but with poorer accuracy.

Table 1. Ratios of Mutant and Wild-type alleles calculated from melting-curve analysis							
	Amount of input wild-type compared to mutant						
	equal	2X	5X	10X	20X	50X	100X
Mutant Copy number	M/WT Ratio st dev	M/WT Ratio st dev	M/WT Ratio st dev	M/WT Ratio st dev	M/WT Ratio st dev	M/WT Ratio st dev	M/WT Ratio st dev
$10^6$	1.040 0.041						
$10^5$	1.030 0.069	0.544 0.044	0.230 0.008	0.108 0.007	0.052 0.008		
$10^4$	1.010 0.055	0.517 0.009	0.227 0.006	0.117 0.010	0.062 0.005	0.027 0.011	0.012 0.007
$10^3$	0.943 0.068	0.503 0.034	0.216 0.015	0.104 0.005	0.051 0.003	0.034 0.005	0.018 0.003
$10^2$	0.967 0.173	0.493 0.036	0.207 0.030	0.116 0.018	0.058 0.006	0.022 0.004	0.011 0.006

Because of the exponential nature of PCR, small differences in reaction efficiencies will have ever greater effects with increasing cycle number. However, the fact that quantitative information can be obtained after 45 cycles of amplification indicates that reaction efficiencies of mutant and wild-type molecules in practice do not differ significantly enough to affect product quantification.

#### Software

Current analysis software used to assess the data takes melting curve data, differentiates with respect to temperature to give melting peaks, and then calculates the best fit of 1 to 3 Gaussian curves to the melting peak data. The only user input is the number of Gaussians to fit. The current software can be further modified to make it possible to analyze melting data for quantification.

The parameters in a Gaussian curve equation are the area of the peak, the position of the center of the peak (mean) and the width of the peak (standard

deviation). The preferred currently available software allows all three values to float. For quantification with internal standards, the number of curves is illustratively two, and the means are known to be within the reproducibility of the machine. Only the area and standard deviation of the curve need to float completely free. The non-linear regression software can be modified to allow the user to enter the expected melting temperatures of target and competitor and the concentration of the competitor in each sample.

The relative melting peak areas are used to calculate HER-2/neu target copy number. Users enter the competitor copy number for each sample. The software takes the data from multiple samples and plots the log of the final target/competitor ratio versus the log of the competitor concentration. This plot should give a line a slope of -1 with a y-intercept equal to the log of the initial target concentration.

#### EXAMPLE 5

The following experiment is conducted to determine quantification of HPV 16 using internal quantification standards with real-time fluorescence PCR on the LightCycler®.

#### DNA/oligonucleotides

Human Papilloma virus DNA is subcloned into pBR322. The following probes and primers are used for cloning, amplification, and detection.

16HI13: 5'-GGGGATCCACTTCAGTATTGC-3' (SEQ ID NO.1);

16RI9: 5'-GGGAATCCATGGCTGATCCTGCAGGTAC-3' (SEQ ID NO.2);

16ICS: 5'-GATCCTGCAGGTACCGATCGGATAGTGAGCGAGAGATAGGTA  
GGGATGGTTTTATGTAG-3' (SEQ ID NO.3);

ICSp913/640: 5'-LC640-CTACCTATCTCTCGCTCACTATCCATC-P-3'  
(SEQ ID NO.4);

16p913: 5'-LC705-ATTACATCCCGTACCCTCTTCCCCATT-p-3'  
(SEQ ID NO.5);

900f16: 5'-CCATGGCTGATCCTGCAGGTAC-3' (SEQ ID NO.6);

1300r16: 5'-CCACTTCAGTATTGCCATACCC-3' (SEQ ID NO.7);

16an913: 5'-CTCGTCATCTGATATAGCATCCCCTGTTTTTTTTTCCACTA

## CAGCCTCTACATAAAACC-FITC-3' (SEQ ID NO.8)

## Fluorescent Dyes

5' LCRed 640 labeled oligonucleotide (Roche Molecular Systems) is conjugated to the oligonucleotide post-synthesis. 5' LCRed 705 labeled oligonucleotide (Roche Molecular Systems) is conjugated to the oligonucleotide during the synthesis reaction, as a phosphoramidite. 3' Fluorescein labeled oligonucleotide (Operon, Inc.), is purified by HPLC.

## Reactions

An artificial system for the detection of initial template DNA copy number has been created from HPV 16 genomic DNA that had been previously cloned into a bacterial plasmid. The HPV 16 artificial template was produced by introducing an EcoRI restriction endonuclease site in the forward primer, and a BamHI restriction endonuclease site in the reverse primer. The PCR product was amplified from the HPV 16 plasmid to produce a sequence that could be readily cloned into a pUC19 plasmid.

Similarly, the internal quantification standard was created from the HPV 16 containing plasmid DNA using a combination of nested PCR primers. The design for creating this artificial sequence can be seen in Fig. 8. In summary, plasmid DNA containing HPV 16 genomic DNA top was amplified with PCR primers 900F16 and 1300R16. 16ICS is a long primer with an internal HPV 16 sequence that has been randomized. The DNA was then amplified with this primer to create the Internal Quantification Standard (IQS) sequence. This randomized region serves as the internal quantification standard probe-binding site. Primers 16RI9 and 16HI13 have been designed to introduce EcoRI and BamHI restriction endonuclease sites for directional subcloning of the final artificial sequence into a pUC19 plasmid. To ensure similar template backgrounds, HPV 16 was also amplified with the primers 16RI9 and 16HI13, to facilitate the directional subcloning of this amplicon into a pUC19 plasmid.

## Producing the Artificial IQS and HPV 16 plasmids

HPV 16 plasmid DNA at 107 copies per  $\mu$ l were aliquoted into 96-well microliter plates. Solutions containing the following final concentrations were prepared: 0.1  $\mu$ M 16HI13 primer, and 0.1  $\mu$ M of either 16RI9 primer or 16IQS primer, 50mM Tris pH 8.3 (25°C), 4.0  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mg/ml Bovine serum albumin, 200  $\mu$ M each dNTP, and KlenTaq DNA polymerase 0.2 Units/ $\mu$ l, 1:30,000 dilution of SYBR® Green I (Molecular Probes). Thermal cycling conditions for the amplification of the artificial HPV 16 and IQS, templates included 1 cycle of sample denaturation at 97°C for 30 seconds. The amplification protocol included 30 cycles of denaturation at 90°C for one second, annealing at 55°C for 2 seconds, extension at 78°C for 18 seconds with a fluorescence acquisition following extension. The ramp rates for each transition was set to the maximum of 20°C/second, except for the transition between the annealing and extension step at 10°C/second. Reactions were run on a 0.8% SeaKem Agarose gel (1xTris, borate, EDTA, ethidium bromide) gel at 80mA for 1.5 hours. The reaction products were visualized by UV light, and product bands were excised from the gel. The products were purified from the gels by Amicon Gel Nebulizers™ (Part No. 42600, Beverly, MA) according to the manufacturer's directions. Following purification, partial IQS template was subjected to a second round of amplification to complete the artificial IQS sequence. The reaction is the same as above, save for the template DNA, which was the partial IQS; and the primers 16RI9, and 16HI13. The final complete IQS sequence was band isolated from a 0.8% agarose gel, and purified as described above.

Purified artificial HPV 16 template, IQS template, and pUC 19 DNA were restriction endonuclease digested with Eco RI and Bam HI (Boehringer Manneheim Biochemicals) according to the manufacturers directions. Following digestion, DNA was band isolated on 0.8% Agarose gels and purified as described above. Purified template DNAs were ligated into the digested pUC19 DNA with T4 DNA ligase (Boehringer Manneheim Biochemicals) at 14°C overnight. Ligated DNAs were transformed into competent *E.coli* DH5 $\alpha$  cells, and plated onto Luria Broth Agar plates containing ampicillin at 125  $\mu$ g/ml. Cells were incubated overnight at 37°C. Single colonies were isolated and grown in Luria Broth containing ampicillin at 125  $\mu$ g/ml for 16 hours. Plasmids were isolated by Promega Wizard Minipreps. Final preparations were boiled for 5 minutes, and DNA concentration was

determined by spectrophotometer readings at  $A_{260}$  and  $A_{280}$ . Inserts were confirmed by amplification with the 900f16 and 1300r16 primers and FRET probe specificity pBECIQS or pBEC16.

The artificial IQS and HPV 16 templates served as the templates in all subsequent reactions. The design of the detection of the IQS product and the HPV 16 product is based around the objective of minimizing the differences between the target and the competitor DNAs. Both IQS and HPV 16 were amplified with a single primer set, 900f16 and 1300r16. A single fluorescein labeled "anchor" probe was used to position the FRET inducing fluorophore adjacent to the detection probes, as seen in Fig. 6. The detection probes are designed specifically to hybridized to either the IQS product, IQSp913, or to the HPV 16 product, 16p913. IQSp913 is an LCRed 640 labeled probe that can be detected in Channel 2 of the LightCycler®. 16p913 is an LCRed 705 labeled probe that can be detected in Channel 3 of the LightCycler®. This internal standard design allows for simultaneous amplification of both the competitor and target DNA in a single reaction cuvette, as well as providing a color-based method for distinguishing the two products.

Fig. 9 illustrates detection of internal quantification standards (IQS) and the HPV 16 artificial template. A single primer pair was designed to amplify the BPV 16 artificial template (900f16/1300r16). This same primer pair also amplifies the internal quantification standard sequence. A 58-mer fluorescein labeled oligonucleotide (16an913), that exactly matches both the artificial HPV 16 and IQS sequences, serves as the FRET anchor. Two additional probes were designed, one to specifically detect the HPV 16 sequence (16p913) and the other for detecting the IQS sequence (ICSp913).

#### Amplifications for quantification analysis

Serial dilutions of plasmid pBECIQS and plasmid pBEC16 were made. DNA templates were aliquoted and mixed into 96-well microtiter plates. Master mix solutions for the quantification contained the following final concentrations: 0.4  $\mu$ M 900f16 primer, 0.1  $\mu$ M 1300r16 primer, 0.3  $\mu$ M of 16an913 fluorescein probe, 0.1  $\mu$ M of each 16p913 LCRed 705 and IQSp913 LCRed 640 probes, 50mM Tris pH 8.3 (25°C), 3.25  $\mu$ M  $MgCl_2$ , 0.25 mg/ml Bovine serum albumin, 200  $\mu$ M each dNTP, and Taq DNA polymerase 0.2 Units/ $\mu$ l. Thermal cycling conditions for the amplification

of the internal quantification standard and the artificial HPV 16 DNA templates included 1 cycle of sample denaturation at 97°C for 30 seconds. The amplification protocol included 50 cycles of denaturation at 92°C for 1 second, annealing at 47°C, fluorescence acquisition following a hold at 5°C for 6 seconds and extension at 78°C for 12 seconds. The ramp rates for each transition was set to the maximum of 20°C/second, except for the transition between the annealing and fluorescence acquisition step that was at 0.4°C/second.

## Results

As indicated above in the derivation of the delta C.T. equation, the detection efficiency of both the target and internal quantification standard DNAs should be equal. To determine whether, in fact, this is met by this system, the crossing threshold for either HPV 16 or the IQS was determined in reactions where both probes were present and only one DNA template was available for detection. As seen in Fig. 10, the crossing thresholds for both the target and competitor DNA are similar. Fig. 10 shows the crossing threshold of the amplification curves following color compensation, baseline subtraction, setting of the noise-band, and finally detecting the cycle threshold at which the amplification curves can be detected. Although the amplification or detection efficiency of these reactions is not linear over the range of concentrations tested, the crossing thresholds are consistent for both the internal quantification standard and the target DNA.

Fig. 10 shows the detection efficiency of Internal Quantification Standard and Artificial HPV 16 template. The data are presented as the average of at least three separate data points, with standard deviations for each.

A typical internal control reaction is depicted in Figs. 11a and 11b. Serial dilutions of the IQS template were prepared ( $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ , ...,  $1 \times 10^3$ ). Each sample contained  $1 \times 10^6$  initial copies of HPV 16 target DNA, and was spiked with one of the serial dilutions of the competitor IQS DNA. The internal standard is detected in channel two (Fig. 11a), the decreasing concentrations of IQS show a typical crossing threshold cycle shift as the initial number of template copies decreases. In Fig. 11b, HPV 16 DNA is shown as detected in channel 3. As expected with a single concentration of initial template DNA,  $1 \times 10^6$ , the cycle threshold of detection is consistently at cycle 28. The data in Figs. 11a and 11b have



been compensated for color overlap from channel 2 into channel 3, using a color compensation file.

The cycle shift that occurs during the amplification when differing initial copies of target DNA and competitor DNA are present is regularly observed in reactions where one DNA template is maintained at a single starting copy number and the other template is varied. In Figs. 12a-c, an example of a typical cycle shift is presented. Three reactions are represented. Each reaction comprises the templates and the probes for IQS and HPV 16 amplification and detection. Internal quantification standard (triangles) and HPV 16 (squares) are multiplexed. In each case, HPV 16 is at an initial template concentration of  $1 \times 10^4$ . The internal quantification standard is at initial template concentrations of  $1 \times 10^5$  (Fig. 12a),  $1 \times 10^4$  (Fig. 12b), and  $1 \times 10^3$  (Fig. 12c). Accordingly, the initial copies of IQS DNA range from ten fold greater than the HPV 16 (Fig. 12a), to ten fold less than the HPV 16 DNA (Fig. 12c). As can be seen in Fig. 12b, where the initial copy number of both the target and the competitor DNAs are the same, the crossing thresholds are identical. However, when the competitor is either ten fold greater (Fig. 12a) or ten fold less than (Fig. 12c) the cycle threshold for the internal quantification standard is earlier or later, respectively, than the cycle threshold for the HPV 16 DNA.

The cycle shift for copy number differences between the competitor DNA (IQS) and the target DNA (HPV 16) was plotted as the change in cycle threshold, between the IQS in channel 2 and the HPV 16 in channel 3, versus the log of the initial copy number of the IQS in the reaction. Fig. 13 represents the data from two separate experiments for each target, HPV 16, DNA concentration each performed in triplicate. HPV 16 initial template concentrations are:  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ , and  $1 \times 10^6$ . Error bars are determined from the standard deviation from four independent reaction data points. The standard deviations are hence a combination of intra- as well inter-experimental variation. The majority of the cycle threshold error arises from inter-experimental variation. The lines plotted represent the trendlines for the averaged delta C.T. data points for each IQS and HPV 16 concentration. A trendline for the averaged delta C.T. data points for each IQS concentration and the  $1 \times 10^4$  HPV 16 concentration is shown in Fig. 13. The trendlines are calculated from a least squares analysis of the best linear fit to the points. Table 2 presents the equations for the linear fit to the trendlines.

The analysis of delta C.T. data from internal quantification standard curves is shown in Table 2. The trendline equations used to calculate target concentrations are shown with the  $\log [T_0]$  indicated in bold. Amplification efficiencies and the actual and calculated concentrations of HPV 16 target DNA are also indicated.

Table 2. Linear best-fit trend line to the data in Figure 8.				
Trendline Equation $\log C_0 = \log E(@n) + \log T_0$	Efficiency	Calculated Copy #	Actual Copy #	% Error*
$y = 0.2802x + 5.9347$ $R^2 = 0.989$	1.91	$0.86 \times 10^6$	$10^6$	13.96
$y = 0.2872x + 4.9235$ $R^2 = 0.9911$	1.94	$0.84 \times 10^5$	$10^5$	16.15
$y = 0.2826x + 3.9527$ $R^2 = 0.988$	1.92	$0.90 \times 10^4$	$10^4$	10.32
$y = 0.2944x + 2.9621$ $R^2 = 0.9885$	1.97	$0.92 \times 10^3$	$10^3$	8.36
$y = 0.289x + 1.8822$ $R^2 = 0.9922$	1.95	$0.76 \times 10^2$	$10^2$	23.76
* The absolute difference between the observed copy # and calculated copy # is represented as the % Error for each particular initial target copy #.				

The log of the slopes of each of these lines was calculated to produce the average reaction efficiency, and the log of the y-intercept was used to calculate the observed target DNA concentration. The observed target concentrations were in each of the samples no greater than 24 percent varied from the estimated concentration based on limiting dilution determination of the DNA concentration and subsequently the initial template copy number in each reaction.

The use of a common set of primers to amplify similar templates and two hybridization probe systems to detect the products of those templates apparently

results in samples that have similar crossing thresholds. The application of this two color detection system to internal quantification standards has been facilitated by the derivation of an equation that uses only a simple manipulation of the crossing threshold data to produce internal quantification with a minimum dynamic range of 10 fold on either side of the target DNA concentration.

While the above examples have incorporated FRET oligonucleotide probe systems, it is understood that other probe systems may be used within the scope of this invention. For example, single-labeled oligonucleotide probes may be used, eliminating the need for the anchor probe. The following example uses both the FRET oligonucleotide probe system (Sensor and Acceptor) and the single-labeled probe system (Sensor probe only).

#### EXAMPLE 6

This example demonstrates that ratios between different nucleic acid targets in a mixture can be quantified using a Thermodynamic Modeling based Signal Processing algorithm. In an exemplary bi-allelic system, allele fractions as low as 1 part in 100 can be determined accurately by aid of this algorithm. This method can be used, for example, to determine allelic patterns of gene expression, allele frequencies in pooled populations, and ratios between different cell types in a mixed tissue sample.

#### Model Bi-allelic System

A single nucleotide polymorphism (SNP) locus in the human p53 gene (GenBank Accession # U94788) is used as target. Detection and analysis of the SNP locus is possible by a 3'-fluorescein-labeled Sensor Probe (5'-GTTCTGCATGGGCGGCATGAAC-F (SEQ ID NO.9)). When matched perfectly to the wild-type target sequence, this probe has a  $T_m$  of 70°C. When hybridized to the mutant allele, probe  $T_m$  is shifted to about 62°C due to the GA mismatch at position 12 from the 5' end of the probe.

This Sensor Probe can be used alone to detect the SNP locus through the fluorescence quenching mechanism in which the signal of the probe decreases upon hybridization by the effect of a G residue on the target strand (See Crockett and Wittwer, Anal Biochem. 2001, 290(1):89-97). Signal change is observed in the F1

channel of the LightCycler apparatus. Illustratively, this probe can also be paired with an Acceptor Probe that is labeled with a fluorescence resonance energy acceptor dye, LCRed640, at its 5' end (5'-GGAGGCCCATCCTCACCATCATCACAC TGGAAG (SEQ ID NO.10),  $T_m=75^{\circ}\text{C}$ ). Signal change from this FRET pair probe system is observed in the F2 channel.

#### Target Preparation

Targets with wild-type and mutant alleles are generated by PCR using Forward primer 5' GCGCACTGGCCTCATCTT (SEQ ID NO.11) ( $T_m=62.9^{\circ}\text{C}$ ), and Reverse primer 5' GGTCAGCGGCAAGCAGA (SEQ ID NO.12) ( $T_m=62.6^{\circ}\text{C}$ ). The amplified samples are purified, quantified spectrophotometrically, and mixed at various known molar ratios.

#### Melting Curve Analysis

The reaction mixture consists of DNA (2000 copies/10 $\mu\text{L}$ ), KlenTaq enzyme (0.8 U/10 $\mu\text{L}$ ), TaqStart antibody (0.088  $\mu\text{g}$ /10 $\mu\text{L}$ ), 0.2mM dNTP, 1X PCR buffer including 3mM  $\text{Mg}^{++}$  (Idaho Technology Inc., UT), and 0.2 $\mu\text{M}$  of the Anchor probe and/or the Sensor probe. Unlike Example 4, it is not necessary to use a high amount of probe as the heterozygote sample in this system provides a melting peak area ratio of about 1. Thermal cycling conditions are  $94^{\circ}\text{C}$  (reached by a transition rate of  $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$ , held for 0 seconds);  $56^{\circ}\text{C}$  (transition rate of  $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$ , held for 5 seconds);  $74^{\circ}\text{C}$  (transition rate of  $2^{\circ}\text{C}/\text{s}$ , held for 7 seconds). After forty PCR cycles, melting curve analysis is conducted by denaturing the sample at  $94^{\circ}\text{C}$ , annealing at  $40^{\circ}\text{C}$ , and melting the double-stranded DNA using a ramp rate of  $0.2^{\circ}\text{C}/\text{s}$ . Fluorescence is monitored continuously during melting. The resulting melting curve data (shown as example in Figs. 16a and 16c for allele ratio of 50:50, and Figs. 17a, 17c for allele ratio of 95:5) are directly analyzed with the Thermodynamic Modeling based Signal Processing (TMBSP) software, and allele ratios estimated. Two external standards (100% of wild type allele, and 100% mutant allele) are provided for the TMBSP analysis method. For estimations of allele fractions using the peak area ratio method, first the melting curve data are converted into melting peak data by taking the negative first derivative (shown as example in Figs. 16b, 16d for allele ratio of 50:50, and Figs. 17b, 17d for allele ratio of 95:5). The data are then analyzed as

described in Example 4, using software such as the LCDA Software (Roche Molecular Biochemicals).

#### Thermodynamic Modeling Based Signal Processing (TMBSP) Algorithm

This algorithm couples digital signal processing with a thermodynamic observation to calculate the mass fractions of materials in a mixture. Digital signal processing is performed using Fast Fourier Transformations and by associating small amplitude Fourier modes with noise in the signal. The thermodynamic modeling is based on the Gibbs free energy of a mixture, and assumes that there are no chemical interactions between melted materials. Additionally, the algorithm includes the ability to analyze the melting signal of a mixed sample in the absence of standards. The method provides the melting temperature and the fraction of the unknown components.

Prior technologies differ from the illustrative method in four ways. First, most technologies perform the signal processing using Fourier-based deconvolution to identify individual components of a signal that is composed of many different species. These methods assume the input signal is a convolution of the individual signals with a predetermined convolution kernel. Examples of this type of method are found in U.S. Patent Nos. 5,273,632, 5,748,491, and 5,346,306. Illustrative methods of this disclosure determine the deconvolution kernel as a component of determining the mass fractions of the materials.

Second, prior technologies determine the desired quantities one at a time. Once a component of the signal is determined, these methods subtract the result from the signal and determine the next component. An example of this type of technology is found in U.S. Patent No. 5,985,120. The methods of this disclosure determine the mass fractions with an "all at once" approach.

Third, prior technologies using digital signal processing have been involved in the analysis of images of PCR amplified samples on an electrophoretic gel or similar devices, as in U.S. Patents Nos. 5,906,919; 5,912,165; 6,066,459; and 6,054,268, or with mass spectrometry as in U.S. Patents Nos. 6,054,268 or 6,268,131. The methods of the present invention do not require post-amplification manipulation of the PCR samples.

Fourth, prior technologies using digital signal processing in PCR based applications, such as U.S. Patent No. 6,221,600, do not use thermodynamic modeling.

The present invention couples the process of determining a set of desired material parameters and simultaneously determining an optimal signal processing scheme.

Digital signal processing with the Discrete Fourier Transform (DFT) has been widely used since the discovery of the Fast Fourier Transform (FFT). The basic idea is to represent the signal as a linear combination of sinusoidal signals (or basis functions), and to keep only those sinusoidal basis functions that contain reliable information about the signal.

A DFT uses a finite number of terms from a Fourier series to approximate a periodic function. The Fourier series can represent periodic function with a reasonable amount of smoothness. Suppose  $f(T)$  is a fluorescence melting signal, then the Fourier series of  $f(T)$  is

$$f(\tau) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} g(k) e^{2\pi i k \tau}$$

where the temperature is rescaled by the change of variables

$$\tau = \frac{T - T_{\min}}{T_{\max} - T_{\min}}$$

The variables  $g(k)$  are the discrete Fourier coefficients of  $f(T)$ . Each coefficient  $g(k)$  is calculated by computing the integral

$$g(k) = \frac{1}{\pi} \int_0^1 f(\tau) e^{2\pi i k \tau} d\tau$$

and the FFT is an efficient method of computing a set of these integrals.

In practice, only a finite number of these terms can be computed, and some terms are meaningless because they represent noise in the signal. The DFT

provides a simple method of eliminating the noise from a signal by setting those discrete Fourier coefficients associated with the noise equal to zero. One is left to decide which coefficients correspond to noise and which correspond to signal.

A mathematical truism is useful to accomplish this. The sum of the moduli of the discrete Fourier coefficients is equal to the norm of the function  $f(T)$ , or

$$\|f(\tau)\|^2 = \sum_{k=-\infty}^{\infty} |g(k)|^2$$

Assuming the noise in the signal is small, a common and safe method of eliminating noise is to use this property and keep enough terms of the DFT so the norms of the actual signal and processed signal are close to one another. Specifically, one sets  $g(k) = 0$  if  $|g(k)| < \sigma$  where  $\sigma$  is a small tuning parameter. If  $K(\sigma)$  is the set of discrete Fourier coefficients that have not been set to zero, then the processed signal is

$$f^\sigma(\tau) = \sum_{k \in K(\sigma)} g(k) e^{2\pi i k \tau}$$

and it has the property that the processed signal is close to the actual signal since

$$\|f(\tau) - \sum_{k \in K(\sigma)} g(k) e^{2\pi i k \tau}\|$$

is small by construction. Additionally, the periodic basis functions that only contribute a small amount to the actual signal are ignored. Usually these basis functions oscillate rapidly and are identified with noise. This procedure has the added benefit that it approximates the actual signal with a small set of data. The only data that need to be stored are the wave numbers in the set  $K(\sigma)$  and the corresponding discrete Fourier coefficients.

#### Thermodynamic Modeling

The fluorescence signal of a PCR product decreases or increases when the product denatures. This process is a phase transition that can be understood using thermodynamics. The thermodynamics of phase transitions of a mixed material are based on the thermodynamics of a phase transition of the base substance.

Consider a mixture of many substances, labeled 1, 2, ..., N. If  $G_i(T)$  is the Gibbs free energies of substance  $i$  as a function of temperature, then the Gibbs free energy of a mixture of these substances is given by

$$G_{mix} = \sum_i m_i G_i(T) + \sum_{i>j} \Delta G_{mix,ij}$$

where  $m_i$  is the mass fractions of the substance  $i$ . The energy from mixing is  $\Delta G_{mix}$ , and it accounts for changes in entropy introduced by mixing species  $i$  and  $j$ . In aqueous solutions, this term is usually small.

Fluorescence melting signals do not measure the Gibbs free energy of a material. However, since the signals are monotonically changing as a function of temperature, temperature itself can be thought of as a function of fluorescence, i.e.,  $T(f)$  where  $f$  is the fluorescent melting signal.

This is a useful observation since  $G_i(T)$  is typically a monotone function of temperature, particularly at temperatures near a phase transition. Since temperature is a function of  $f$ , composing  $G_i(T)$  with  $T(f)$  implies that  $G_i$  is a function of fluorescence. Finally because  $G_i$  is a monotone function one can think of fluorescence as a function of  $G_i$ .

These observations suggest that one can model the fluorescence of a PCR mixture as

$$f_{mix} = \sum_i m_i f_i(T) + \sum_{i>j} \Delta f_{mix,ij}$$

where  $f_i$  is the fluorescence melting signals of species  $i$ , and where  $f_{mix}$  is the fluorescence melting signal of the mixture of species  $i$  with  $j$ .

Given the fluorescence melting signals,  $f_i$ ,  $f_{mix}$ , and ignoring the fluorescence mixing terms, a good approximation for the mass fractions of the substances can be found by minimizing the following objective function over all choices of  $m_i$  between zero and one.

$$\int_0^1 \left\| f_{mix} - \sum_i m_i f_i(T) \right\| dT$$

Basis Function Approximation



The fluorescence melting signal to be analyzed may or may not have standard melting signal such as  $f_i$  described above. When the standard signals are missing, they must be approximated. The illustrative approximation scheme is based on the observation that the fluorescence melting signal of the products is essentially linear at temperatures greater than the melting transition (i.e., at the “melted phase”), and non-linear at temperatures less than the melting transition (i.e., at the “annealed phase,” see Fig. 20).

To approximate the standard signals, the fluorescence melting signals of all PCR mixtures are scaled relative to one reasonable signal, and an approximation of the remainder data is calculated. The mathematical model used is:

$$f'(T) = P_1(T) \left( 1 - \sum_j m_j M_j(T) \right) + P_2(T) \sum_j m_j M_j(T)$$

and the terms in the model are defined as the following:

- $T$  – temperature
- $f'(T)$  – approximated fluorescence of the melting curve
- $P_1(T)$  – nonlinear function representing the fluorescence in the annealed phase
- $P_2(T)$  – linear polynomial representing the fluorescence in the melted phase
- $M_j(T)$  – fraction of species  $j$  that has melted;  $M_j(T)=0$  implies species  $j$  is annealed and  $T_j$  is the melting temperature
- $m_j$  – constant mass fraction of species  $j$  in the sample vessel

Finally all the summations in the model include  $N$  terms, with one term for each melt.

The model was constructed using a combination of observed behavior and elementary thermodynamics. The background terms  $P_i(T)$  are solely based on experience with the data, while the linear combinations of the fractional melting equations are based on the free energy of a mixture of materials. The free energy is equal to the sum of the free energies of the components of the mixture to first order. Changes in the free energy of the materials are the driving force for a phase transition in the probe-melting experiments, therefore, it is expected that the fluorescence of the samples will be nearly linear combinations of the fluorescence of the individual species. In this context, the terms  $M_j(T)$  represent the probability that a type  $j$  probe is attached to its target. The melting terms  $M_j(T)$  depend on two parameters: the melting

temperature  $T_j$  at which the curve is steepest in the melting transition, and the width of the melting transition  $w_j$ .

#### Algorithm Coupling

In the first step of the full algorithm, scaling is performed, and the samples with no melting signal ("negatives") are found. Then parameters that specify the remainder functions are found. Finally an iterative process adds one remainder at a time, and minimizes the objective function

$$\min_{m_i, \sigma} E(m_i, \sigma, T_j) = \int_{T_0}^{T_1} \left\| f_{\text{mix}}^\sigma - \sum_i m_i f_i^\sigma(T) - f'(T) \right\| dT$$

to simultaneously find the smoothing parameter  $\sigma$ , the mass fractions of the known standards  $m_i$ , and the melting temperature and mass fraction parameters of the remainder functions,  $T_j$  and  $m_j$ . The iterative process is terminated when the mass fractions sum are bigger than  $1-\varepsilon$  where  $\varepsilon$  is a tolerance, and when the approximated melting signal of the mixed material is sufficiently close to  $f_{\text{mix}}$ . The previously computed results serve as inputs to the optimization software that minimizes the objective function. The tolerance limit  $\varepsilon$  used in the algorithms is proportional to the relative size of the noise in the signal. Other methods of selecting the tolerance could be used.

A flow chart of the full algorithm process is shown in Fig 18. The top box is the entry into the algorithm, and users specify the standards and unknowns. The second box determines the scale factors of all the signals and determines whether any of the signals are negatives. The third box signifies where the parameters of the remainder function are determined. If combinations of the standards adequately model the unknown melting curve, then the remainder parameters will be zero. In the absence of known standards  $f_i$ , then the approximated curves  $f'$  will be used exclusively.

The bottom three boxes form the iterative algorithm to find all the components of the unknown. First the minimization problem defined in this section is solved for the current set of standards and remainders. Then the model is compared against the unknown, and if the fit is within a tolerance limit, the algorithm stops and

reports its results. If the fit is not within the tolerance limit, then the algorithm determines a new standard and repeats the solution of the minimization problem.

## Results

The wild-type allele fraction is estimated (as "Output") using (1) the Thermodynamic Modeling Based Signal Processing (TMBSF) method, and (2) the melting peak area ratio analysis method by use of the LCDA software. In Tables 3 and 4, those outputs are compared against the actual allele fraction in the sample ("Input"). Output of TMBSF analysis is obtained for all allele fractions regardless of the probe system used. The values agree well with the Input values. Output of melting peak area ratio analysis is obtained only for the FRET pair probes in which allele fractions are greater than 10% and lower than 90% (Table 3). The LCDA software used for this analysis was unable to provide the melting peak area ratio for the Sensor probe-only system due to the opposite direction of signal change in the melting curve data (Figures 16b, 17b). The LCDA software is also not able to detect allele fractions of 10% and lower, or 90% and greater.

TABLE 3. Data obtained using Sensor probe only		
Input fraction of wild-type allele (%)	Output of melting peak area ratio analysis (%)	Output of TMBSF analysis (%)
2	—	2
5	—	5
10	—	11
20	—	20
50	—	49
80	—	78
90	—	85
95	—	92
98	—	94

TABLE 4. Data obtained using FRET pair (Sensor and Acceptor) probes		
Input fraction of wild-type allele (%)	Output of melting peak area ratio analysis (%)	Output of TMBSP analysis (%)
2	--	3
5	--	7
10	7	14
25	16	24
33	29	34
40	33	39
50	47	52
60	56	61
66	67	70
80	78	80
90	--	87
95	--	92
98	--	95

The difference between Output and Input values are plotted against the Input value (Fig 19). A difference of zero indicates complete concordance between Output and Input values. The difference between Input, and Output using the TMBSP method has a mean of - 0.15 (SD=2.4), and the confidence interval at 95% includes zero, indicating the high accuracy of estimations generated by the TMBSP algorithm. The mean difference between Input, and Output using the melting peak area ratio analysis is -4.2 (SD=2.9). The 95% confidence interval does not include zero, indicating a bias with the melting peak area ratio method.

#### EXAMPLE 7

This example demonstrates that the gene dosage in a mixture can be quantified using the Thermodynamic Modeling based Signal Processing (TMBSP) algorithm.

In an exemplary system, a gene locus of interest is studied for deletion or duplication using the addition of a known amount of non-amplifiable competitor DNA prior to PCR. After PCR, dosage ratio between the gene locus and the competitor in a wild type sample is compared against the ratio in unknown samples by aid of the algorithm. For instance, deletions and duplications at the exon level are

known to exist in tumor suppressor genes, and while they are considered important in a variety of tumors, including breast cancer, bladder cancer, and hereditary non-polyposis colorectal cancers, detailed studies of these large deletions and duplications have been difficult due to limitations of conventional analytical methods. In this exemplary system, analysis of such large deletions or duplications is facilitated.

PCR primers are selected to amplify a segment of the gene locus of interest. Typically, the segment is 100 to 200 bp in length, although the segment can be longer or shorter. A sequence specific probe system, for example a set of hybridization probes, or alternatively, a single-labeled probe, that is complementary to a portion of the amplified segment is provided. Illustratively, this segment is void of known single nucleotide polymorphisms. In addition, a single-stranded competitor polynucleotide, also generally complementary to the probe(s) but mismatched at one or more bases, is provided. This competitor strand is illustratively shorter than the amplified segment, typically 50 to 60 bases, and lacks the region required for primer hybridization, so the competitor does not amplify during PCR. Also, the 3' end of the competitor is phosphorylated to suppress self-priming. For a typical reporter probe that is 17 to 19 bases long, a single base mismatch and/or an additional one base deletion on the competitor strand creates a 10 to 12 °C shift in melting temperature ( $T_m$ ). With such a change to the competitor sequence, the competitor and the target of interest may be differentiated by  $T_m$ . Alternatively, the probe can be designed to match the competitor fully (with a mismatch to the target).

Illustratively, 1  $\mu$ M of competitor is added to 10ng of human genomic DNA in a 10  $\mu$ L PCR reaction mixture that contains 0.1 to 0.2  $\mu$ M of primers and other reagents for amplification. The probe(s) are also provided at a concentration of 0.2  $\mu$ M.

After PCR, melting curve analysis is performed on samples that all contain the same known amount of competitor. Typically, it is not necessary to start the melting curve analysis at the exponential phase of PCR. Amplified material produced after 40 to 45 cycles of PCR, and thus in the plateau phase, will provide adequate data. Two tiers of standards are used: the first tier comprises 1) a wild type sample without the competitor and 2) the competitor by itself; the second tier comprises the wild type sample mixed with the competitor. From melting curves of the first tier standards, the TMBSP algorithm computes the ratio of gene locus to the

competitor in the mixed wild type standard. Unknown samples are then similarly analyzed and normalized to the ratio in the wild type. Samples that are wild type have a normalized ratio of 1.0. Samples in which the locus of interest is deleted in one chromosome (but not in the other) have a normalized ratio of 0.5. Samples with a one-fold duplication of the locus in one chromosome have a normalized ratio of 1.5.

#### EXAMPLE 8

The exemplary system in Example 7 is further modified to accommodate situations in which the amount of sample DNA prior to PCR is not controlled. The use of a housekeeping gene to normalize the amount of DNA across samples is well known. A second set of probes for the housekeeping gene, preferably labeled with a dye of different fluorescent color than the first set of probes, and a second competitor for the housekeeping gene in exactly the same amount as the first competitor, are added to the sample. Alternatively, a chimerical competitor carrying the sequences of the first and second competitors is used to ensure equal dosage of the two competitor sequences. The ratio of the housekeeping gene versus the competitor is calculated by use of the algorithm in all samples, and then used to normalize the dosage of the gene locus.

#### EXAMPLE 9

The system described in Example 7 is further simplified by the additional use of the basis function approximation algorithm (detailed in Example 6). In this case, only one standard melting curve is required. The approximation algorithm takes the melting curve of the wild type sample that is mixed with its competitor, and separates the curve into two standard curves (one for the gene alone and the other for the competitor alone). The ratio of gene locus to competitor in the wild type sample is assigned 1.0. The algorithm-generated standard curves are then used to calculate the ratios in unknown samples using the TMBSP algorithm. The final answers are the same as those generated in Example 7.

#### EXAMPLE 10

This example demonstrates that the mass fraction (or molar ratio) of two or more nucleic acids in a biological sample can be quantified using the

Thermodynamic Modeling based Signal Processing (TMBSP) algorithm without limitation to use of the same PCR primer set for amplification, or the same probe sets for the different nucleic acids.

Segments of the human HER-2/neu gene and the housekeeping gene beta-actin are amplified using separate PCR primers for each gene, and melting analysis is performed also using separate probes. The probes are fluorescently labeled to allow detection of both genes by one detection channel on the LightCycler<sup>®</sup> instrument. The probes also have different melting temperatures ( $T_m$ ) so that the two genes can be distinguished. Example 4 describes the HER-2/neu probes in which the LCRed640 dye is used on the reporter probe that has a  $T_m$  of 64°C. U.S. Patent No. 6,174,670, describes beta-actin probes in which the reporter probe is labeled with Cy5 and has a  $T_m$  of about 74°C (U.S. Patent No. 6,174,670 SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4). The melting curve data from the wild type standard is first analyzed by the basis function approximation algorithm to convert the data into two separate melting curves. Then the ratio of Her-2/neu to beta-actin in other samples is calculated by the TMBSP algorithm, using the ratio in the wild type standard as 1.0. It is also contemplated that using similar approaches, mass fractions (or molar ratio) of more than two nucleic acid species can be quantified in a biological sample.

Although the invention has been described in detail with reference to preferred embodiments, variations and modifications exist within the scope and spirit of the invention as described and defined in the following claims.

## CLAIMS:

1. A method of determining mass fractions of first and second target nucleic acids present in a test sample, said method comprising the steps of

- (a) contacting the target nucleic acids with a fluorescent nucleic acid indicator, the indicator being configured to provide a signal related to the quantity of indicator hybridized to the target nucleic acid, the indicator further configured to discriminate the target nucleic acids based on melting temperature,
  - (b) illuminating the test sample,
  - (c) monitoring fluorescent change to generate a melting curve, and
  - (d) using a thermodynamically based signal processing algorithm
- to determine the mass fraction of the target nucleic acids.

2. The method of claim 1 further comprising the steps of  
 defining standard melting curves  $f_i$  for each target nucleic acid having a standard melting curve, and

defining a melting curve  $f_{mix}$  of an unknown sample,

wherein the thermodynamically based signal processing algorithm simultaneously finds a smoothing parameter  $\sigma$ , mass fraction  $m_i$  of each of the nucleic acid targets present in the unknown sample, and melting temperature and mass fraction parameters of remainder functions, and uses a coupled optimization and iterative process to minimize

$$\int_{T_0}^{T_1} \left\| f_{mix}^{\sigma} - \sum_i m_i f_i^{\sigma}(T) - f'(T) \right\| dT,$$

said optimization and iterative process repeated until a sum of the mass fractions is  $> 1 - \epsilon$ , where  $\epsilon$  is a tolerance value.

3. The method of claim 1 wherein the mass fraction of the target nucleic acids provides information concerning a deletion or a duplication in a gene.

4. The method of any of claims 1-3 wherein the fluorescent nucleic acid indicator comprises a fluorescently-labeled sequence specific oligonucleotide probe.



5. The method of claim 4 wherein the sequence specific oligonucleotide probe is selected from the group consisting of a FRET pair probe system and a single-labeled oligonucleotide.

6. The method of any of claims 1-5 wherein the second target nucleic acid is a competitor of the first target nucleic acid for the fluorescent nucleic acid indicator.

7. The method of any of claims 1-6 wherein the test sample further comprises a thermostable polymerase and a pair of oligonucleotide primers configured for amplifying the first target nucleic acid, said method further comprising the step of

amplifying the target nucleic acid, said amplifying step occurring prior to the step of using the thermodynamically based signal processing algorithm.

8. A method of quantifying a target nucleic acid present in a biological sample, said method comprising the steps of

(a) combining in a single reaction vessel at least a portion of said sample, a thermostable polymerase, a known concentration of a competitor nucleic acid, a pair of oligonucleotide PCR primers, and an oligonucleotide probe;

wherein said pair of oligonucleotide PCR primers is configured for amplifying a selected segment of the target nucleic acid and the competitor nucleic acid; wherein said competitor nucleic acid has a unique section having a different sequence from a corresponding region of the target nucleic acid; and wherein the competitor nucleic acid and the target nucleic acid are amplified with essentially equal efficiency;

said oligonucleotide probe labeled with a first fluorophore and configured to hybridize to the unique section of the competitor nucleic acid and the corresponding region of the target nucleic acid;

wherein hybridization of the oligonucleotide probe to at least one of its respective complementary target nucleic acid and competitor nucleic acids results in a change in the magnitude of fluorescence from the fluorophore;

(b) amplifying the selected segment of the target and competitor nucleic acids; and

(c) illuminating the biological sample and monitoring fluorescent change from the first fluorophore.

9. The method of claim 8 wherein the illumination step includes melting curve analysis.

10. The method of claim 9 wherein the melting curve analysis includes using a thermodynamic modeling based signal processing algorithm.

11. The method of claim 8 wherein  
the competitor nucleic acid further comprises a first section having a sequence identical to a corresponding first region of the target nucleic acid;  
the oligonucleotide probe is an anchor probe configured to hybridize to the first section of the competitor nucleic acid and to the first region of the target nucleic acid, adjacent to the unique section of the competitor nucleic acid and adjacent to the second region of the target nucleic acid;

the combining step further comprises combining a target probe and a competitor probe in the reaction vessel, said competitor probe labeled with a second fluorophore and configured to hybridize to said unique section of the competitor nucleic acid sequence, and said target probe labeled with a third fluorophore and configured to hybridize to said second region of the target nucleic acid sequence; and

wherein hybridization of the anchor, target, and competitor probes to their respective complementary target nucleic acids and competitor nucleic acids places the first fluorophore and the second fluorophore as well as the first fluorophore and the third fluorophore in a resonance energy transfer relationship.

12. The method of claim 8 wherein step (c) includes monitoring the fluorescence as a function of time, the method further comprising the steps of

(d) creating an amplification profile for the target nucleic acid and an amplification profile for the competitor nucleic acid; and

(e) comparing the amplification profile of the target nucleic acid with the amplification profile of the competitor nucleic acid to determine a cycle shift between the competitor and target nucleic acids.

13. The method of claim 12 wherein the steps (a) through (c) are repeated using varying known concentrations of the competitor nucleic acid, and the method further comprises the step of

(f) determining an initial concentration of the target nucleic acid using the equation  $\log C_0 = \log E(\Delta n) + \log T_0$ , wherein  $C_0$  represents the initial concentration of the competitor nucleic acid,  $E$  represents the efficiency of

amplification,  $\Delta n$  represents the cycle shift between the competitor and target nucleic acids, and  $T_0$  represents the initial concentration of the target nucleic acid, wherein a line generated therefrom has a slope equal to the log of the efficiency of amplification and a y-intercept equal to the log of the initial concentration of the target nucleic acid.

SEQUENCE LISTING

<110> University of Utah Research Foundation  
Idaho Technology  
Eyre, David J.  
Rasmussen, Randy P.  
Caplin, Brian E.  
Wade, Stevenson  
deSilva, Deepika M.

<120> REAL-TIME GENE QUANTIFICATION WITH INTERNAL STANDARDS

<130> 7475-71275

<150> US 60/316,614  
<151> 2001-08-31

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> synthesized sequence for cloning.

<400> 1  
ggggatccac ttcagtattg c

<210> 2  
<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized sequence for cloning.

<400> 2

gggaattcca tggctgatcc tgcaggta

<210> 3

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized sequence for cloning.

<400> 3

gacccctgcag gtaccgatcg gatagtgagc gagagatagg tagggatggt tttatgtag

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized sequence for detection of internal quantification standard.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-LC640 Fluorescent label

<400> 4

ctacctatct ctcgctcact atccatc

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized sequence for detection of artificial HPV 16 sequence.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-LC705 Fluorescent label

<400> 5

attacatccc gtaccctctt cccatt

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized sequence for cloning.

<400> 6

ccatggctga tcctgcaggt ac

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized sequence for cloning.

<400> 7

ccacttcagt attgccatac cc

<210> 8  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthesized sequence for detection of internal quantification standard and artificial HPV sequence.  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (59)..(59)  
<223> 3'-fluoresein Fluorescent label  
  
<400> 8  
ctcgtcatct gatatagcat ccctgtttt tttttccact acagcctcta cataaaacc  
  
<210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(23)  
<223> 3'-fluoresein Fluorescent label  
  
<400> 9  
gttcctgcat gggcggcatg aac  
  
<210> 10  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-LC640 Fluorescent label

<400> 10

ggaggcccat cctcaccatc atcacactgg aag

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gcgcactggc ctcacatt

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ggtcagcggc aagcaga

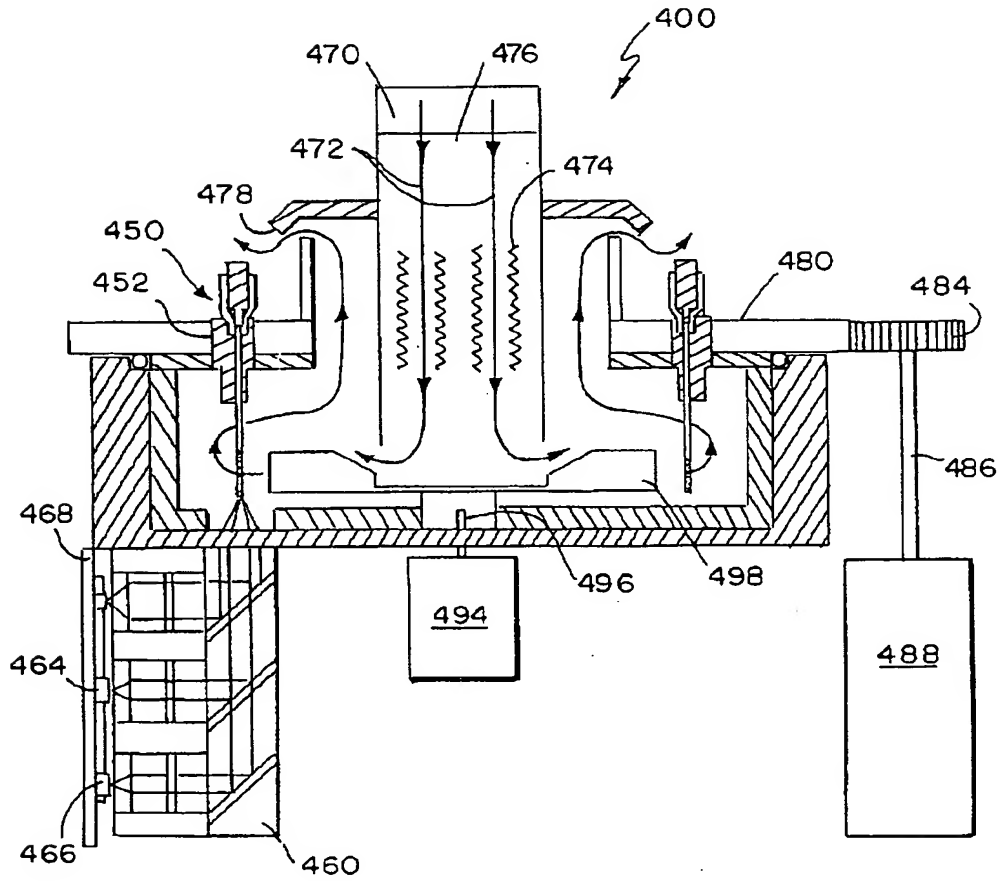


FIG. 1



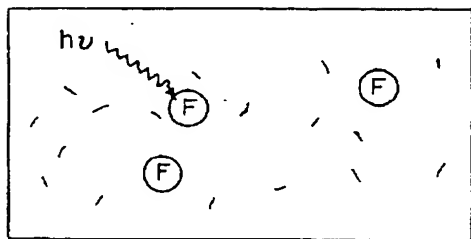


FIG. 2a

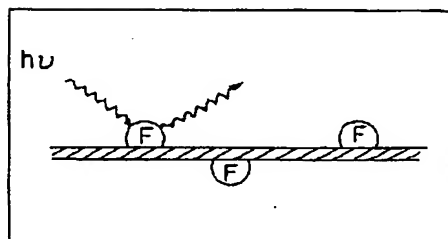


FIG. 2b

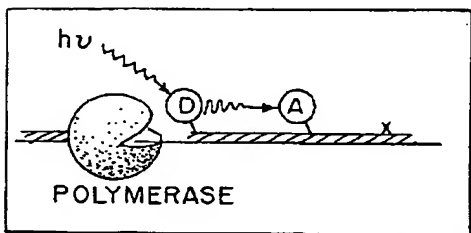


FIG. 2c

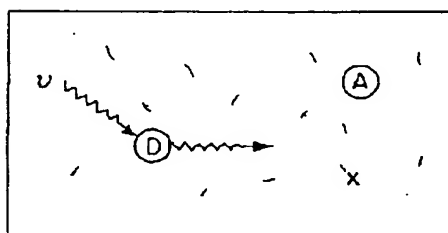


FIG. 2d

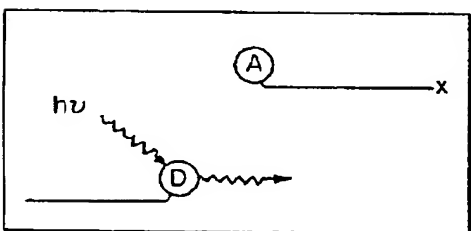


FIG. 2e

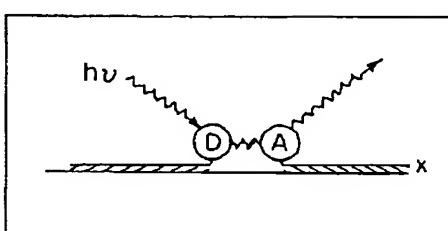


FIG. 2f

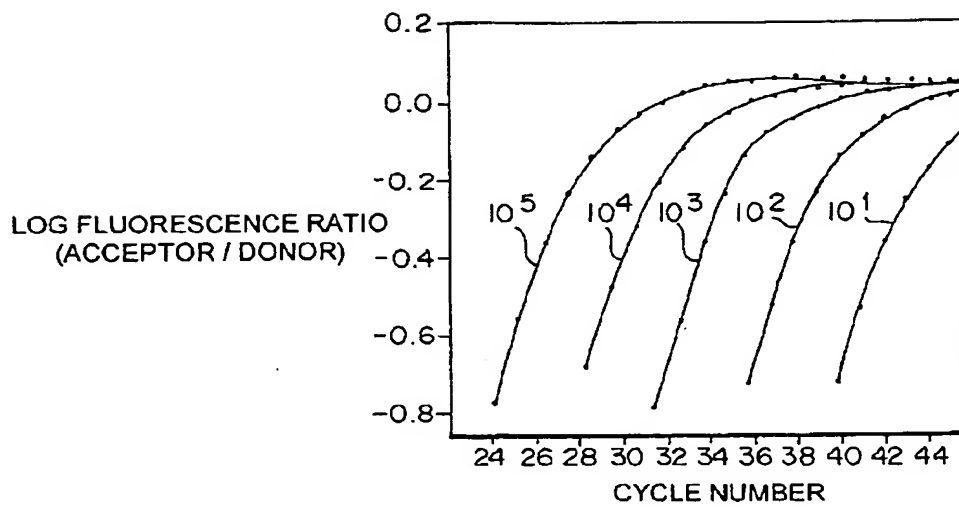


FIG. 3a

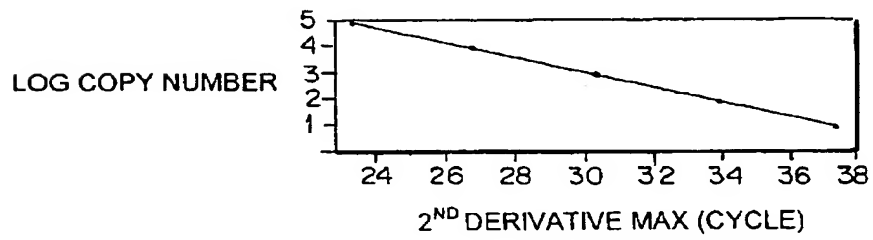


FIG. 3b

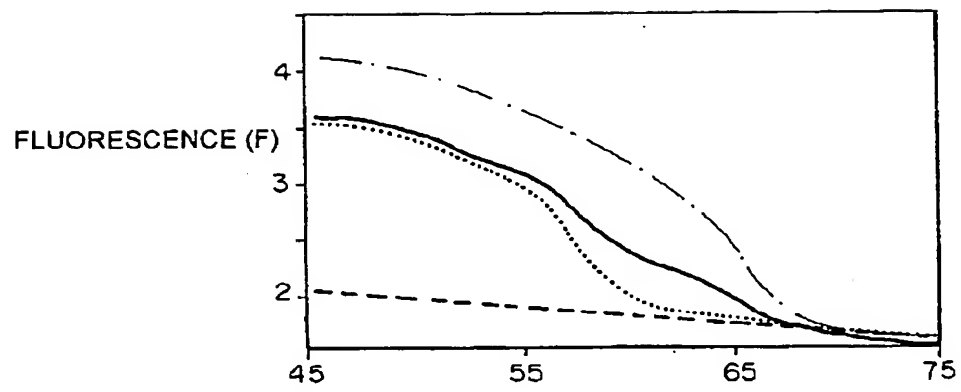


FIG 4a

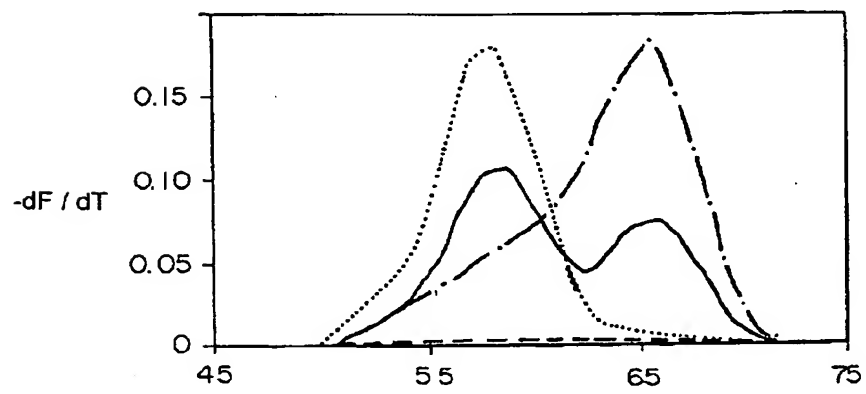


FIG 4b

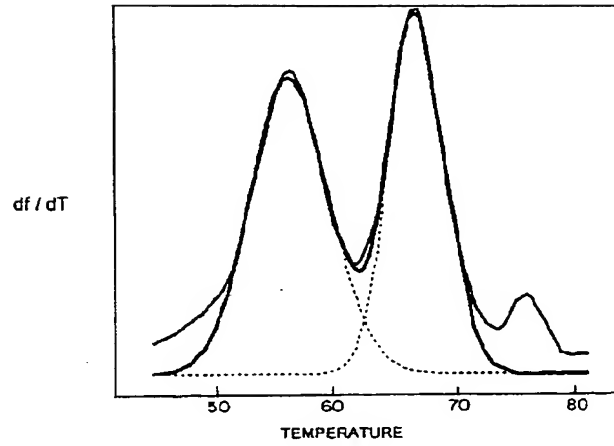


FIG. 5a

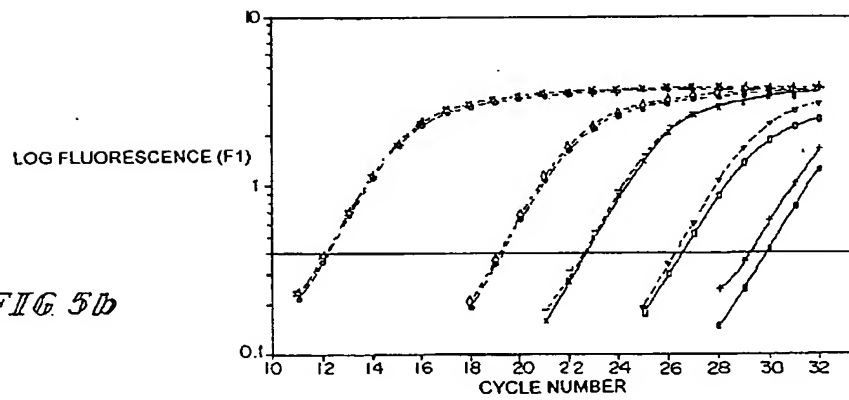


FIG. 5b

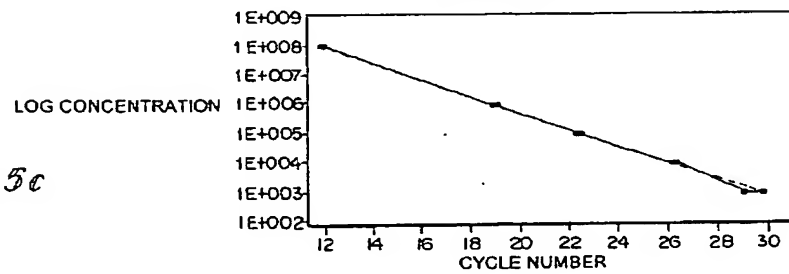


FIG. 5c

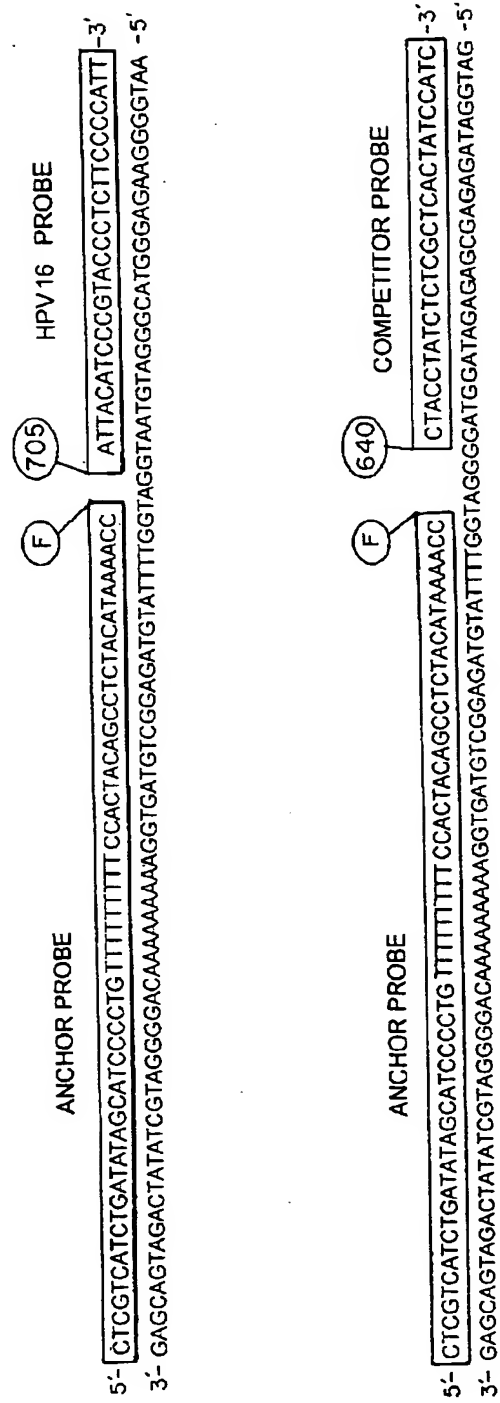


FIG. 6

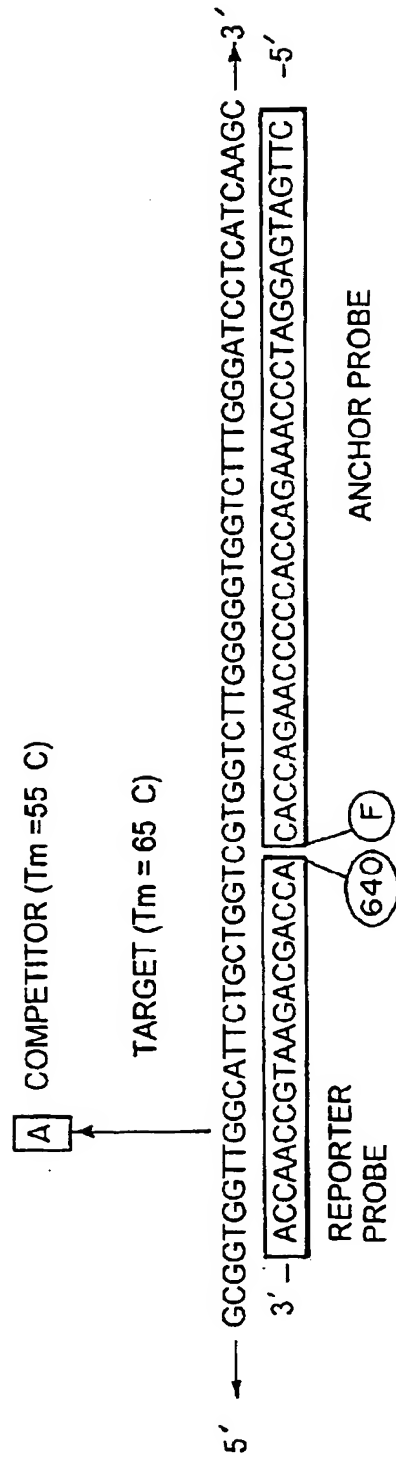


FIG. 7

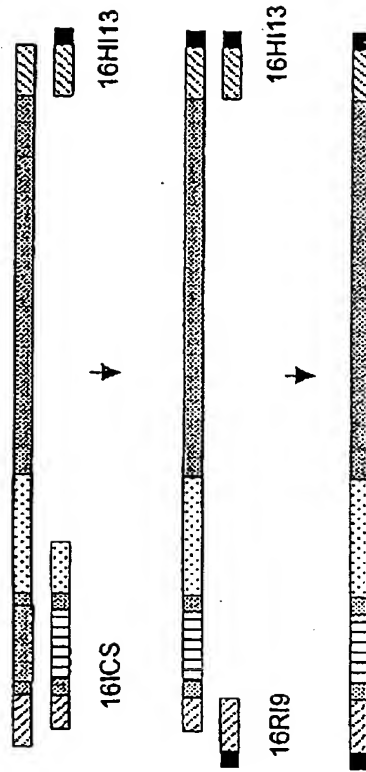


FIG. 8

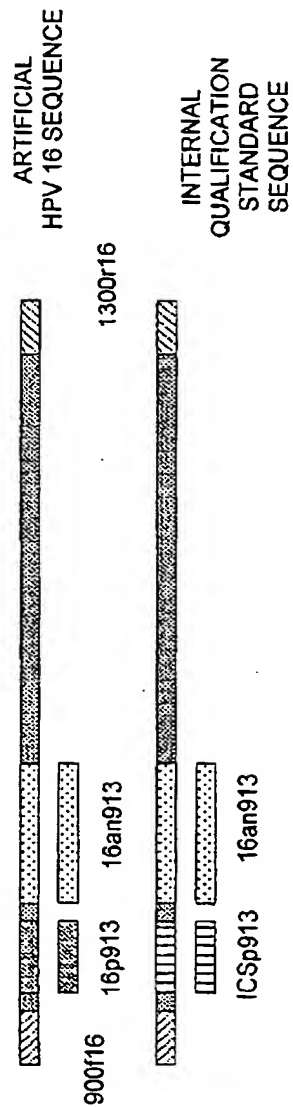


FIG. 9



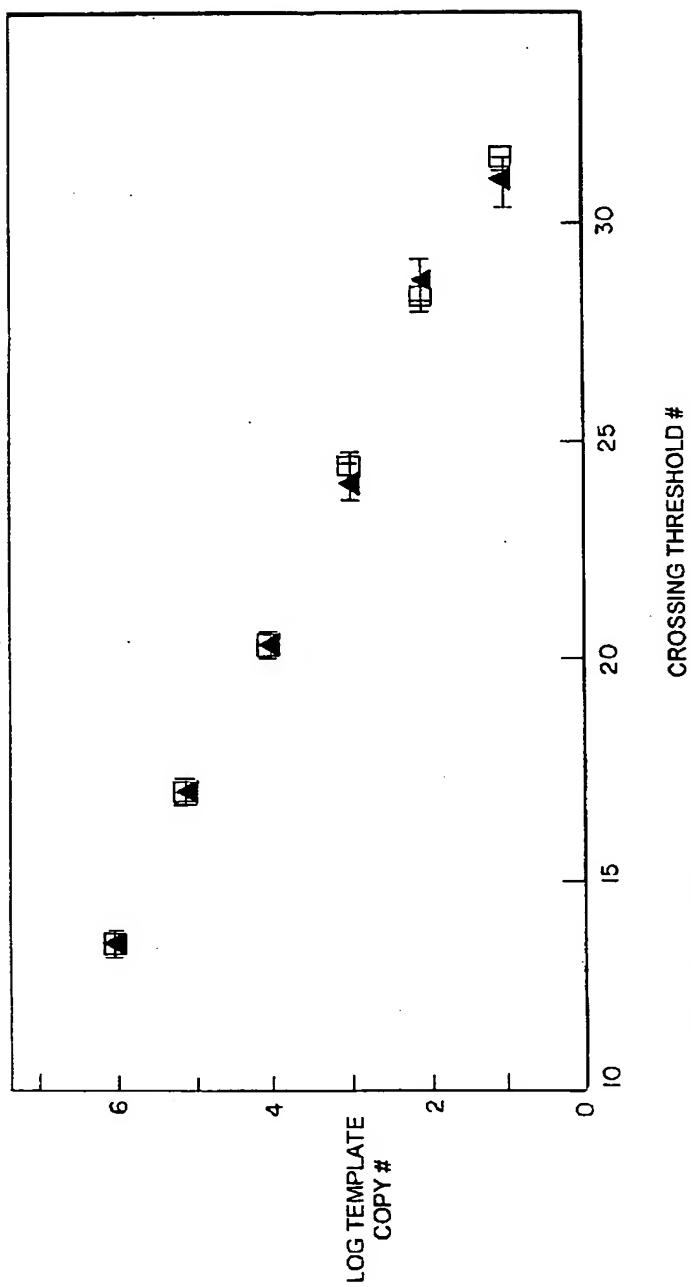


FIG. 10

PANEL A

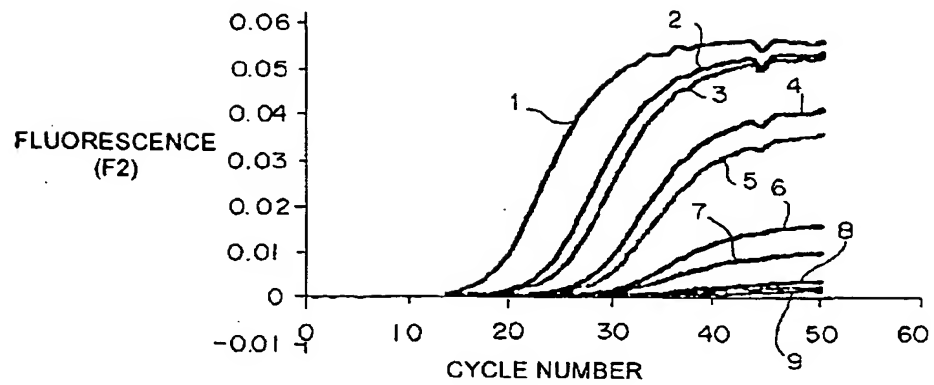


FIG 11a

PANEL B

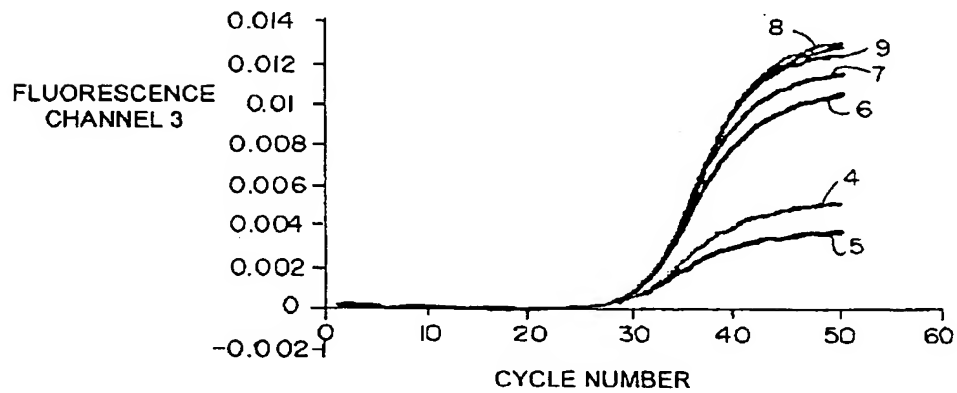


FIG 11b

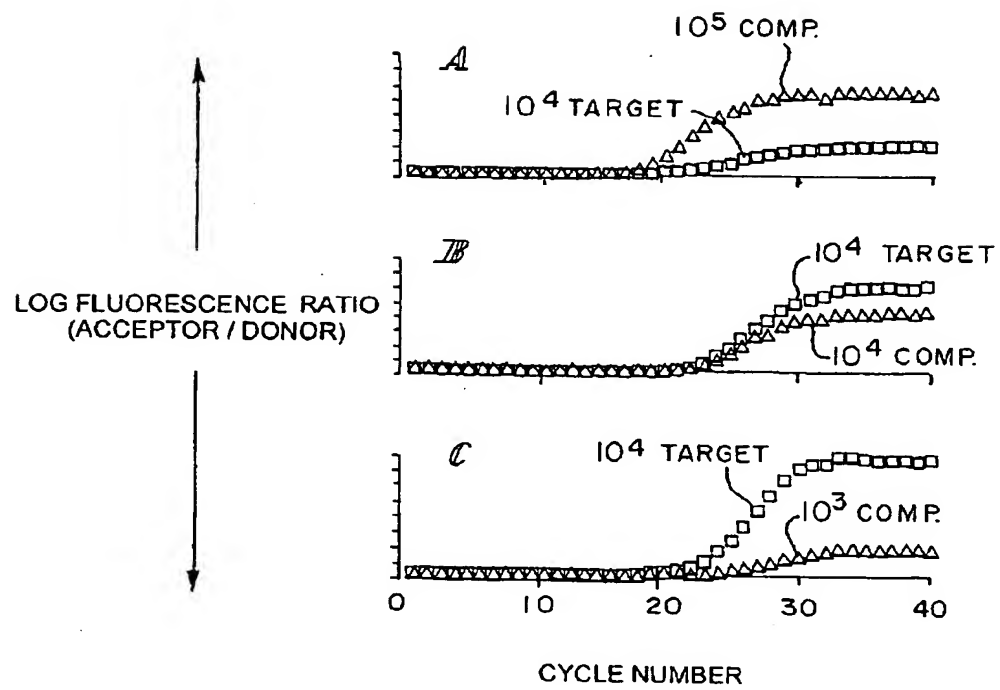


FIG. 12

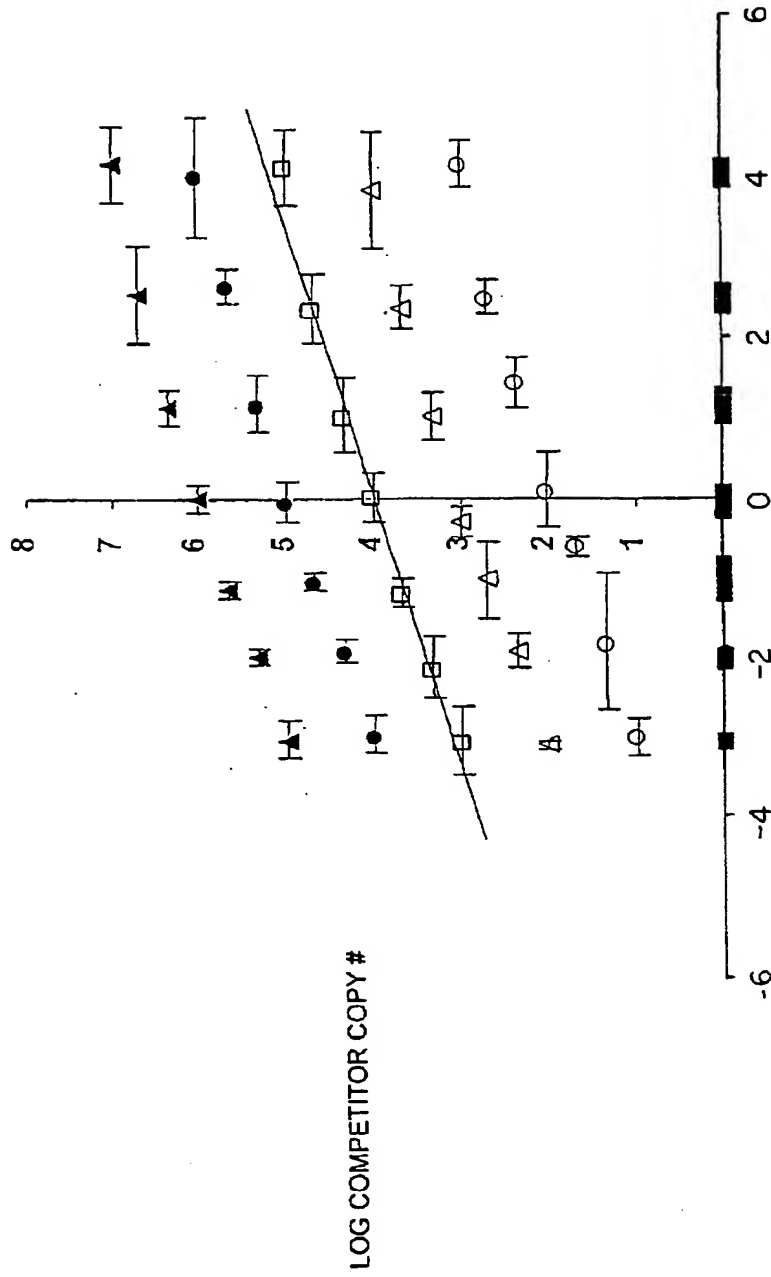
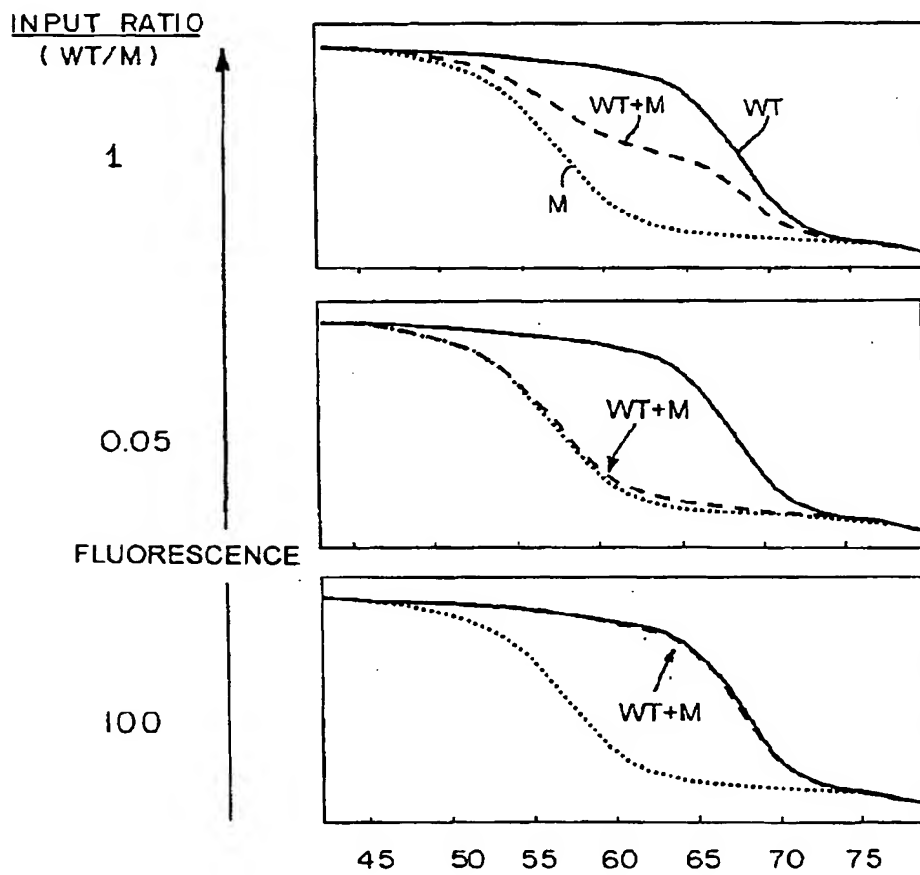
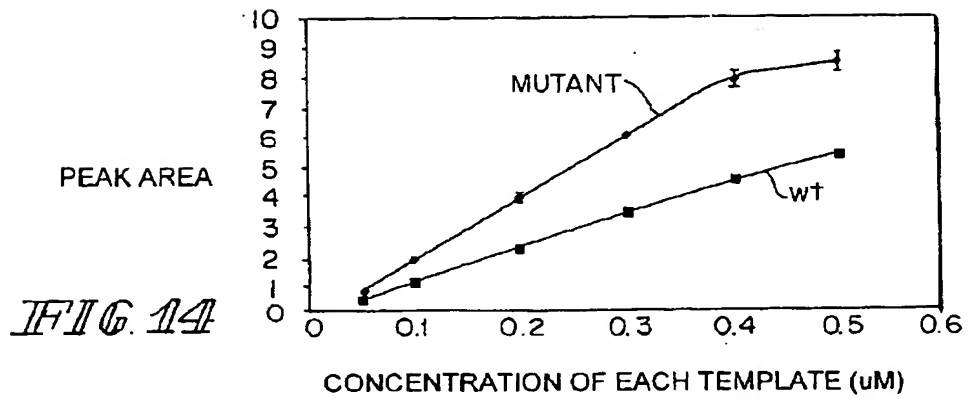


FIG 13



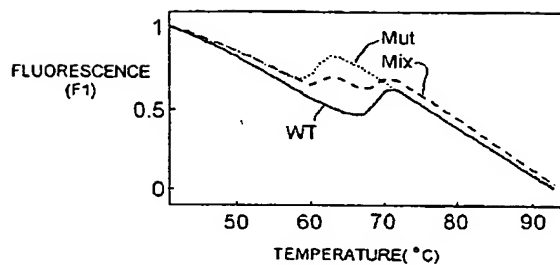


FIG. 16a

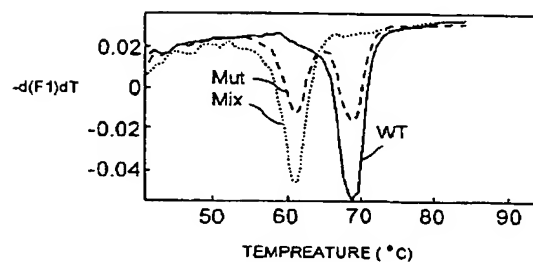


FIG. 16b

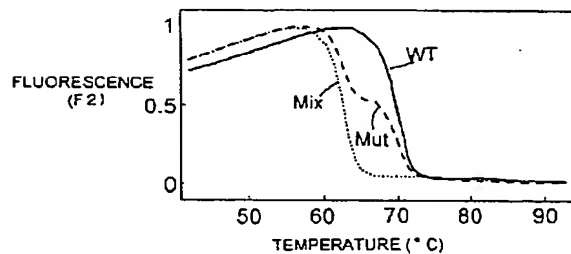


FIG. 16c

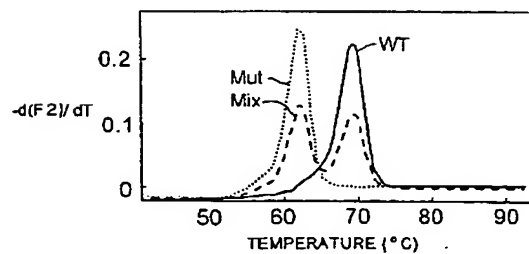


FIG. 16d

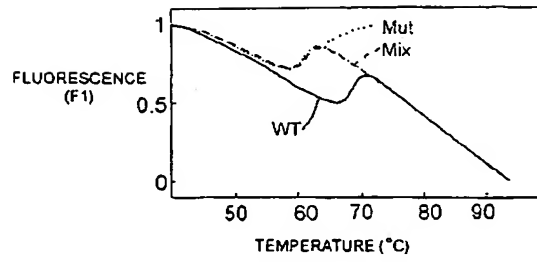


FIG 17a

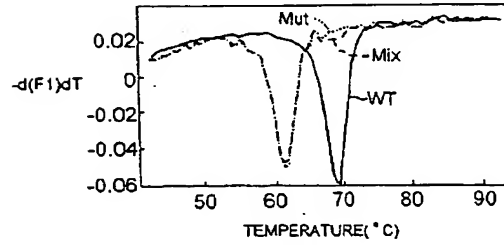


FIG 17b

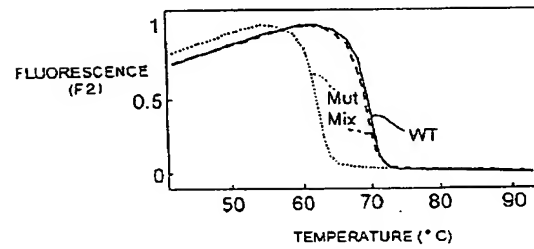


FIG 17c

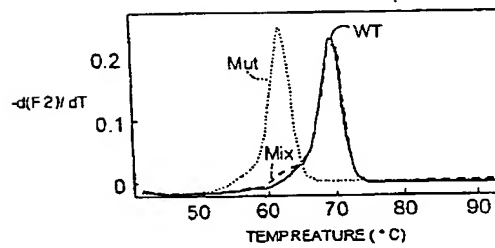


FIG 17d

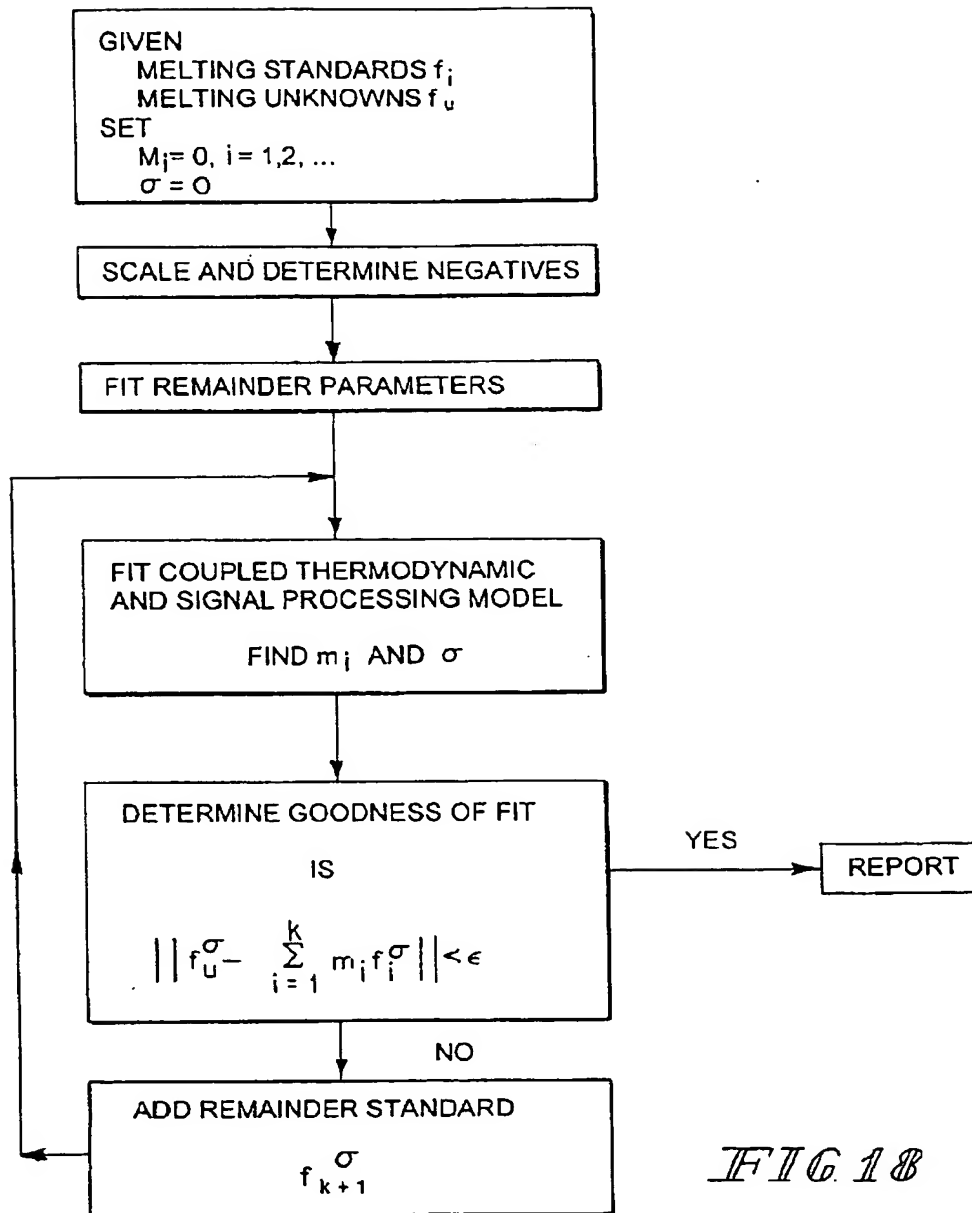
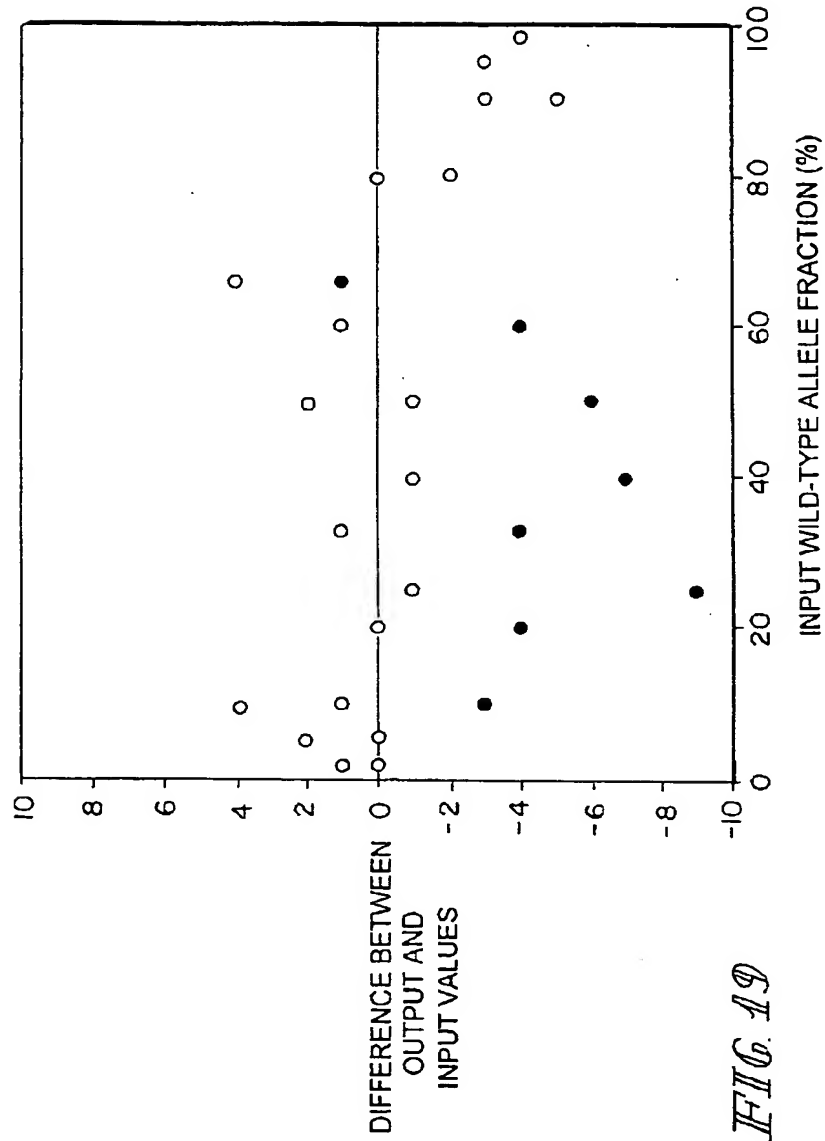
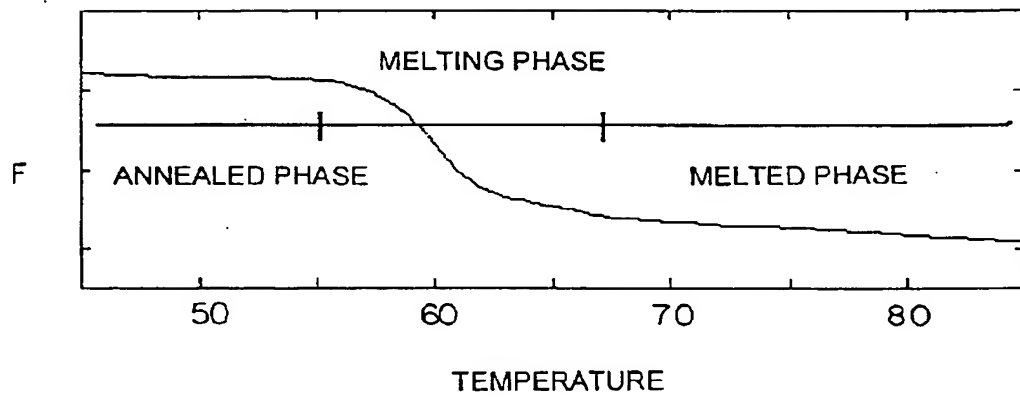


FIG 18







*FIG. 20*

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

The present invention is directed to a nucleic acid quantification kit and method for determining the initial concentration or mass fraction of a target nucleic acid present in a sample. Illustrative embodiments include real-time competitive quantitative polymerase chain reaction (PCR) to determine the copy number or mass fraction of a target nucleic acid sequence in a sample and use of a thermodynamically based signal processing algorithm, with or without PCR, to provide mass fraction information.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**